Universitätsklinikum Ulm
Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm (IKT)
Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier

Induktion Granzym B-exprimierender regulatorischer B-Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Johanna Marie Veh
geboren in Dillingen an der Donau

2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Jahrsdörfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Hönig

Tag der Promotion: 14.07.2023

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht in:

Frontiers in Immunology

Veh J, Mangold C, Felsen A, Ludwig C, Gerstner L, Reinhardt P, Schrezenmeier H, Fabricius D and Jahrsdörfer B: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). doi: 10.3389/fimmu.2023.1194880CC. CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Die Widmung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 B-Zellen und ihre Differenzierungswege 1
1.2 Regulatorische B-Zellen 2
1.2.1 B10-Zellen 3
1.2.2 *GraB cells* 4
1.3 Zielsetzung 14
2 Material und Methoden 15
2.1 Material 15
2.1.1 Geräte 15
2.1.2 Zellmaterial 16
2.1.3 Laborbedarf 17
2.1.4 Puffer und Lösungen 18
2.1.5 Chemikalien 20
2.1.6 Reagenzien und Stimulanzien 20
2.1.7 KITS 22
2.1.8 Antikörper und Fluorochrome 22
2.1.9 Software 24
2.2 Methoden 25
2.2.1 Ethikvotum 25
2.2.2 Zellisolationen 25
2.2.3 Zellkultur und Zellstimulation 28
2.2.4 Durchflusszytometrische Färbungen 28
2.2.5 PanToxiLux-Assay 32
2.2.6 Europium-Release-Assay 36

2.2.7 Statistische Auswertung 38
3 Ergebnisse 39
3.1 Induktion regulatorischer *GraB cells* 39
3.1.1 Stimulation mit anti-BCR und IL-21 39
3.1.2 Alternative Stimulanzien zur Induktion von *GraB cells* 44
3.1.3 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat als Induktor von *GraB cells* 53
3.1.4 Expression von Oberflächenmarkern auf *GraB cells* 63
3.2 *GraB cells* in einem allogenen *Mixed Lymphocyte Reaction*-Modell 67
3.2.1 Zytotoxizität von TC gegenüber allogenen PBMC 67
3.2.2 Einfluss von *GraB cells* auf die spezifische Lyse von allogenen PBMC durch zytotoxische T-Zellen 69
4 Diskussion 70
4.1 Induktion von *GraB cells* 70
4.1.1 Stimulation mit B21 70
4.1.2 Alternative Wege zur Induktion von *GraB cells* 74
4.1.3 Phänotypisierung von *GraB cells* 80
4.2 Einflussnahme von *GraB cells* in einem allogenen *in-vitro*-GvHD-Modell 83
4.2.1 PanToxiLux-Assay 83
4.2.2 Europium-Release-Assay 84
5 Zusammenfassung 87
6 Literaturverzeichnis 89
Abbildungsverzeichnis VI
Tabellenverzeichnis VIII
Anhang IX
Danksagung XI
Lebenslauf XII

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogenkarbonat
AML	Akute Myeloische Leukämie
anti-BCR	Antikörper gegen den B-Zell Rezeptor
APC	Allophycocyanin
B10	Stimulation von BC mit IL-10
B21	Stimulation von BC mit IL-21 100 ng/ml + anti-BCR 12 µg/ml
BC	B-Zelle, B-Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BLNK	B cell linker- Protein
Breg	Regulatorische B-Zelle
BtK	Bruton-Tyrosinkinase
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cGvHD	chronische GvHD
CIA	Collagen-induced Arthritis
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CRS	Cytokine Release Syndrom, Zytokin-Freisetzungssyndrom
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCM	Flow Cytometry, Durchflusszytometrie, Durchflusszytometer
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
GMP	Good Manufacturing Practice
GraB cell	Granzym B-exprimierende regulatorische B-Zelle
GrB	Granzym B

GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Spender-gegen-Empfänger-Reaktion
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HSP	Hitzeschockprotein
i. v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP_3	Inositoltrisphosphat
JAK	Januskinase
$KHCO_3$	Kaliumhydrogencarbonat
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	Mediane Fluoresezenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MZP	Marginal zone precusor
NA_2EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
P21	Stimulation von BC mit PMA 50 ng/ml und IL-21 100 ng/ml
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PHA	Phytohämagglutinin
$PLC\gamma_2$	Phospholipase C gamma 2
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PS	PanCyToxiLux™ Substrate
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean

SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	Seitwärtsstreulicht, Side Scatter
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TC	T-Zelle, T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TRF	time resolved fluorescence, zeitaufgelöste Fluoreszenz

1 Einleitung

1.1 B-Zellen und ihre Differenzierungswege

Das Immunsystem ist ein sensibles Spannungsfeld gegensätzlicher Entitäten: Immunität und Autoimmunität, Fremd-Protektion und Selbst-Toleranz stehen sich antithetisch gegenüber. In der Homöostase dieses Gefüges nehmen B-Zellen eine elementare und zugleich kontroverse Rolle ein. Diese hängt entscheidend von ihrer Differenzierung ab. Grundsätzlich lässt sich die Bildung der B-Lymphozyten in eine fetale (B1) und in eine adulte (B2) Form untergliedern. Endprodukte fetaler, hepatischer B-Zell-Bildung sind B1-Zellen. Diese sind überwiegend in der Pleura- und Peritonealhöhle lokalisiert. Ihre TC-unabhängige und kontinuierliche Produktion unspezifischer und polyreaktiver Antikörper ordnet sie dem angeborenen Immunsystem zu [90, 100]. Durch die Erkennung mikrobieller Polysaccharid-Antigene bilden B1-Zellen eine frühe Barriere zur Kontrolle des Infekt-Geschehens im Vorfeld der adaptiven Immunantwort [12].

Hiervon abzugrenzen ist die adulte Form der medullären BC-Bildung (B2-Zellen): Ausgehend von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle werden zur Gewährleistung einer hohen BCR-Variabilität verschiedene Reifestadien durchschritten. Die naive B-Zelle weist einen $B220^{+}CD19^{+}CD24^{+}$ $CD43^{-}$- Phänotyp auf. Mit anschließender Migration in Richtung sekundär lymphatischer Organe werden drei transitionale Übergangsformen ausgebildet: T1, T2, T3 [5]. In der Milz reifen diese Übergangsformen zu reifen B-Zellen heran. Sie bilden in Abhängigkeit von BAFF-, APRIL-, NF-κB-, NOTCH-2- und BCR-Signalen Marginalzonen-B-Zellen oder follikuläre B-Zellen aus [2, 22]: Marginalzonen-B-Zellen (MZB) befinden sich in der Randzone der weißen Pulpa. Sie fungieren als kurzlebige Plasmazellen und bilden polyreaktive und niedrig-affine Antikörper aus. Ihr protektiver Einfluss richtet sich gegen mikrobielle im Blut zirkulierende Pathogene. Mit dem Augenmerk auf der überbrückenden Erregerabwehr weisen sie Parallelen zu B1-Zellen auf. Follikuläre BC stellen dagegen den Ausgangspunkt für die terminalen B2-Differenzierungsschritte im Primärfokus und im Lymphfollikel dar. Follikuläre B-Zellen der dunklen Zone der Lymphfollikel werden der Keimzentrumsreaktion unterzogen. Dazu gehören die Affinitätsreifung, die somatische Hypermutation, Selektion und Klassenwechsel. Endpunkte dieser Reifungsschritte sind langlebige und spezifische Plasmazellen und Gedächtniszellen. Plasmazellen bestimmen über die Produktion hochaffiner Antikörper die humorale Immunantwort.

Sie neutralisieren Pathogene direkt oder aktivieren das unspezifische Immunsystem. Im Falle einer Reinfektion differenzieren B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen und senken so die Reaktionszeit des Immunsystems.

1.2 Regulatorische B-Zellen

Nicht minder bedeutsam und doch weniger erforscht ist die Existenz einer weiteren B-Zellpopulation – der *regulatorischen B-Zellen*. Dieser heterogene Zell-Typus imponiert durch seine Vielzahl an Unterarten. *Regulatorisch* meint dabei die Fähigkeit, Immunreaktionen zu unterdrücken und so beispielsweise die Selbsttoleranz des Immunsystems zu steigern. Als Quellen dieses regulatorischen Potentials wurden ursprünglich B1-Zellen, T2-Zellen, MZBs und Gedächtniszellen vermutet [2, 92, 93].

Prägend in der Entdeckung regulatorischer B-Zellen war die Herstellung eines Zusammenhangs zwischen selektiver BC-Depletion und der Ausbildung eines Kontaktekzems bei Meerschweinchen in den 1970er Jahren [108, 141]. Daran anknüpfend wurde ein positiver Einfluss von B-Zellen auf den Verlauf einer experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) im Mausmodell beschrieben [150]. Die Arbeitsgruppe um Mizoguchi und Bahn erbrachte im Weiteren in einem Mausmodell zur chronischen Colitis um 2000 den Nachweis für die regulatorischen, suppressiven Eigenschaften von B-Zellen gegenüber T-Zellen. Sie wurden im Folgenden als regulatorische B-Zellen (Breg) klassifiziert [99]. In der Summe entspringt diesen Erkenntnissen die erwähnte Kontroverse über den Einfluss von B-Zellen auf Autoimmunerkrankungen: Als Produzenten von Antikörpern und Autoantikörpern gelten B-Zellen als Ursprung von Autoimmunprozessen [123]. Diesem Sachverhalt stehen die positiven antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekte der kürzlich entdeckten *regulatorischen B-Zellen* gegenüber. Auch eine Einflussnahme im Rahmen von neoplastischen, hyperinflammatorischen und viralen Erkrankungen ist beschrieben. Fillatreau und Kollegen deklarierten Interleukin-10 als zentralen Wirkfaktor immunregulatorischer B-Zellen [44]. Diese IL-10^{+} B-Zellen bezeichnet man als *B10-Zellen*. Sie dominieren bislang die Literatur auf dem Gebiet der regulatorischen B-Zellen.

1.2.1 B10-Zellen

1.2.1.1 Interleukin 10

Als immunmodulatorischer Akteur beeinflusst IL-10 CD4-positive T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen [101]. Letztere werden durch IL-10 in ihren exekutiven Funktionen, Antigenpräsentation und Zytokin-Produktion, beeinträchtigt: Die Oberflächen-Rezeptoren MHC II und CD86 stehen im Dienst der Antigenpräsentation und Costimulation. IL-10-bedingt werden sie vermindert exprimiert [25, 37, 38, 149]. Außerdem verschiebt sich die Differenzierung von Monozyten zugunsten der Ausbildung von Makrophagen. Die Differenzierung in dendritische Zellen erfolgt dann nachrangig [3]. Indem IL-10 NF-κB inhibiert, verändert es das vorherrschende Zytokin-Milieu [30, 147]. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1ß, IL-6, IL-8, IFN- γ, G-CSF, M-CSF und TNF-α erfahren eine Abnahme. Anti-inflammatorische Mediatoren dagegen werden gefördert [36, 66].

An T-Helferzellen wirkt IL-10 immunsuppressiv: Über eine Hemmung der IL-12- und IFN-γ-Sekretion inhibiert es die T_{H1}-Antwort [33]. Das Resultat ist eine Verschiebung der T_{H1}-T_{H2}-Balance in Richtung T_{H2} [8, 45]. Aber auch die T_{H2}- Antwort selbst sowie die T_{H17}-Antwort unterliegen einer IL-10-bedingten Hemmung [9]. Dagegen werden *Regulatorische TC* durch IL-10 positiv reguliert [52, 160]. Diese spielen eine maßgebliche Rolle bei der Selbsttoleranz des Immunsystems. Zusammengefasst wirkt IL-10 antiinflammatorisch und immunsupprimierend. Es begründet die beschriebenen immunregulatorischen Effekte von B10-Zellen.

1.2.1.2 Unterarten regulatorischer B10-Zellen

Murine B10-Zellen präsentieren sich phänotypisch überwiegend als $CD19^{+}CD1d^{hi}CD5^{+}$-Zellen[16, 99, 155]. In Transfer-Modellen zur Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) und Myasthenia gravis induzierten sie über IL-10 eine Remission und demonstrierten so ihr immunregulatorisches Potential [121, 156].

Ein zweiter muriner Subtyp, $CD19^{+}CD1d^{hi}CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}$, entspringt den T2-MZP [1, 2]. Seine immunregulatorischen Kapazitäten basieren auf einer ausgeprägten Th_1- und Th_{17}-Hemmung via IL-10 sowie einer starken Stimulation von Tregs [24, 111, 164]. Der adoptive Zelltransfer dieses T2-Typus wirkte sich präventiv auf die Ausbildung, und therapeutisch auf die Symptomatik einer CIA aus [43]. Ferner steigerten anti-CD40-induzierte T2-Bregs in Transferexperimenten das

Überleben Lupus-induzierter Mäuse [14]. Auch die Toleranz gegenüber Hautallotransplantaten konnte auf ein überproportionales Vorkommen an T2-Bregs zurückgeführt werden [102].

Im menschlichen Organismus existieren ebenfalls B10-Zellen unterschiedlichen Phänotyps. Unter ihnen dominieren die $CD24^{hi}CD27^{+}$ Bregs [68, 161]. Quantitative Defizite begleiten Abstoßungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus, Arthritiden, und Morbus Basedow [161, 164]. Regelhafte B10-Spiegel in Gesunden und Genesenen implizieren dabei einen Zusammenhang von Krankheits-Pathogenese und B10-Zahl. Bei der Rheumatoiden Arthritis konnte eine inverse Korrelation von B10-Zellen und Rheumafaktor, B10-Zellen und CRP, sowie B10-Zellen und Krankheitsaktivität festgestellt werden [31].

Daneben gibt es humane B10-Zellen vom $CD24^{hi}CD38^{hi}$ -Typ. Für ihre funktionale Integrität ist eine regelhafte Signalgebung mit CD40-Signaling und JAK-STAT-Phosphorylierung elementar. Fehler in dieser Signalkette führen zu defekten Bregs und tragen zur Ausbildung eines SLE bei [15]. Kürzlich wurde eine verminderte Zahl beider humaner B10-Zell-Typen bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ I beschrieben [39].

1.2.2 *GraB cells*

Im Jahre 2006 entdeckten Jahrsdörfer und Kollegen einen neuen Subtyp regulatorischer B-Zellen. Bis dato begrenzte sich das Spektrum regulatorischer B-Zellen weitgehend auf IL-10-produzierende B10-Zellen. Die Arbeitsgruppe um Jahrsdörfer beschrieb erstmals IL-21-abhängige B-Zellen mit der Fähigkeit zur negativen Regulation des Immunsystems durch Granzym B – sogenannte *GraB cells* [55].

1.2.2.1 Interleukin 21

IL-21 besitzt immunstimulierende, antivirale und antineoplastische Eigenschaften [6, 63, 70, 146]. Im Kontext von *GraB cells* wird IL-21 eine Schlüsselrolle zugesprochen. Es entstammt der IL-2-Familie und bildet mit seinen 133 Aminosäuren eine tetra-α-helikale Struktur aus [77, 131]. Die Sekretion des Zytokins erfolgt durch CD4-positive T-Zellen (T_{FH}, TH_{17}) und NKT-Zellen [57, 130]. Der korrespondierende IL-21-Rezeptor ist mit der *common-gamma-chain* (γ_c) assoziiert und wird überwiegend von Lymphozyten wie TC, BC und NK-Zellen exprimiert

[57, 77, 94, 112, 115]. Auf B-Zellen wirkt IL-21 pleiotrop. Richtungsweisend für die letztendliche Wirkung ist die Art der Costimulation: Parallele IL-21- und TLR-Stimulation (LPS, CpG) initiiert in unreifen B-Zellen eine BIM-assoziierte Apoptose [74, 95]. Zudem fördert IL-21 die Produktion von Immunglobulinen. In Kombination mit IL-4 reguliert es den Isotypenwechsel zugunsten IgG_1, IgG_3 und IgA [10, 18, 113].

Einen besonderen Einfluss hat IL-21 auf die terminale Differenzierung von B-Zellen. Es ist sowohl für die Ausbildung von Plasmazellen, als auch für die Produktion regulatorischer *GraB cells* elementar. Die An- bzw. Abwesenheit des CD40-Liganden auf T-Zellen bestimmt dabei den Differenzierungsweg: Für die Differenzierung zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen bedarf es gleichzeitig der IL-21-Signalgebung, der BCR-Stimulation und der Interaktion von CD40 und seinem Liganden (s. Abbildung 1). CD40 wird regelhaft von B-Zellen exprimiert [142]. Das Gegenstück, der CD40-Ligand, wird auf T-Helferzellen exprimiert, wenn diese vollständig aktiviert sind. Hierzu ist eine parallele Stimulation des TCR und eine intakte CD28-Costimulation erforderlich [11, 40, 55, 113].

Die Induktion von *GraB cells* erfolgt dagegen in Abwesenheit des CD40-Liganden bei alleiniger IL-21- und BCR-Stimulation. Ursache für das Ausbleiben der Expression des CD40-Liganden ist eine inkomplette TC-Aktivierung bei mangelnder CD28-Costimulation. Diese Grundsätze der BC-Differenzierung bestätigten sich bei Experimenten mit peripheren B-Zellen HIV-infizierter Patienten. HIV-Infizierte wiesen hierbei eine verminderte Expression von CD40-Ligand auf, was in einem erhöhten Prozentsatz an *GraB cells* resultierte. Unter Zugabe von CD40-Ligand kam es erwartungsgemäß zu einer Abnahme an *GraB cells* und einer parallelen Zunahme an Plasmazellen. Auch im Zusammenhang mit einer NEMO-Mutation im CD40-Signaling eines jungen Patienten mit einer Immundefizienz bestätigte sich der inhibierende Einfluss von CD40-Ligand. Mangels CD40-Signalings differenzierten sich BC dieses Patienten nach Stimulation in vitro mit IL-21 vornehmlich zu *GraB cells* [55, 76].

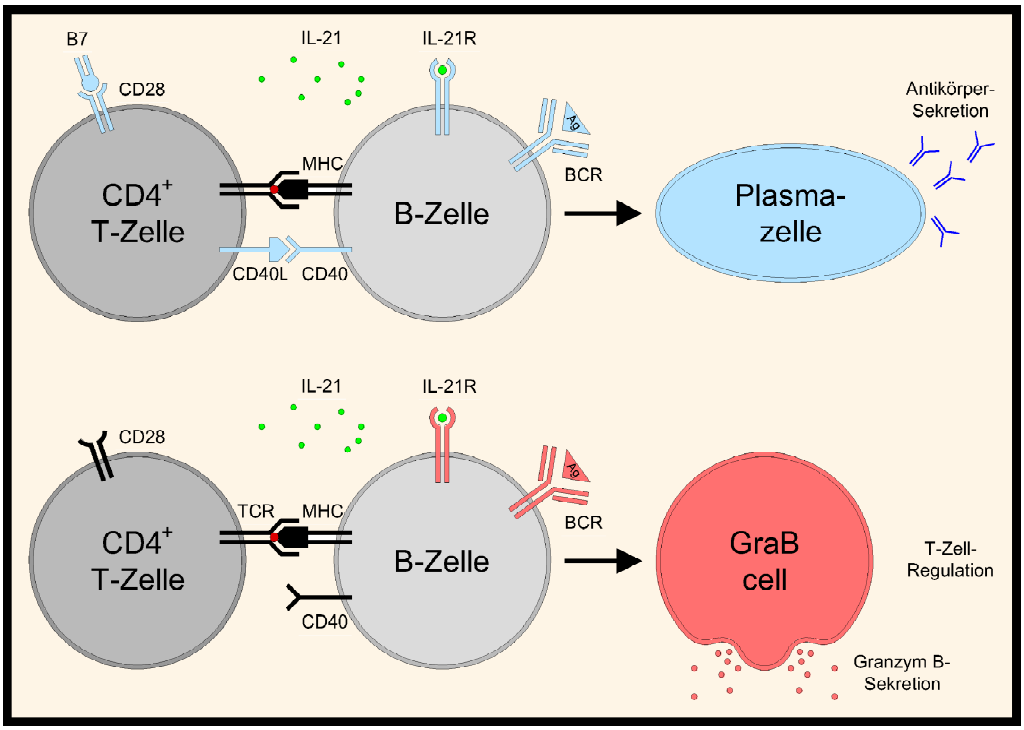


Abbildung 1 | B-Zell-Differenzierung in Abhängigkeit von der CD40-Ligation: In der oberen Bildhälfte ist eine vollständige T-Zell-Stimulation (T-Zell-Rezeptor (TCR), CD28) dargestellt. Sie zieht die Expression von CD40-Ligand nach sich. Gemeinsam mit der Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) und des Interleukin 21-Rezeptors (IL-21R) bilden sich Antikörper-produzierende Plasmazellen (blau). In der unteren Bildhälfte ist eine inkomplett-aktivierte T-Zelle dargestellt. Mangels Costimulation wird kein CD40-Ligand exprimiert. Es erfolgt eine Differenzierung in Granzym B-exprimierende regulatorische B-Zellen (*GraB cells,* rot). Diese setzen Granzym B (GrB) frei, welches immunregulatorisch wirken kann. Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

1.2.2.2 Granzym B

1.2.2.2.1 Eigenschaften

Im Zentrum *GraB cell*-vermittelter Immunregulation steht Granzym B [54, 55, 85]. Hierbei handelt es sich um eine Serinprotease der Masse 32 kD. Es gehört zur Familie der *granule enzymes* und wird gemeinsam mit Granzym H, Cathepsin G und Chymase auf dem menschlichen Chromosom 14q12 exprimiert [61]. Als Hauptproduzenten dieses Granzyms gelten zytotoxische TC und NK-Zellen [73, 116, 117]. Daneben sind auch dendritische Zellen, Tregs, Granulozyten, Mastzellen und B-Zellen als Produzenten beschrieben [49, 69, 72, 133, 140]. Im Endoplasmatischen Retikulum wird zunächst ein zymogener Vorläufer ausgebildet: Das Signalpeptid wird abgespalten und die inhibitorische Terminalsequenz beibehalten (proGrB) [21, 86, 127]. Das Proenzym wird mittels Mannose-6-Phosphat markiert und im Golgi-Apparat in lytischen Granula gespeichert [34, 50,

81, 127]. Die Aktivierung erfolgt durch GrB-Convertasen, u. a. Cathepsin C und Cathepsin H, indem sie das N-terminale Di-Peptid (Gly-Glu) entfernen [34]. Freigesetzt werden die GrB-Vesikel exozytotisch. Die Aufnahme in Zielzellen erfolgt Perforin-abhängig oder -unabhängig. Letzteres kann z. B. über Endozytose, Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, Hitze-Schock-Proteine (HSP70), virale Proteine oder Heparansulfat-Rezeptoren geschehen [46, 51, 62, 81, 104, 145]. Entgegen der für Serinproteasen typischen Spaltung von Substraten nach Lysin oder Arginin entfaltet GrB seine lytische Aktivität an Aspartat-Resten [109, 122, 137].

1.2.2.2.2 Funktionen

Granzym B (GrB) ist für seine mannigfaltigen Funktionen zytotoxischer, immunregulatorischer und extrazellulärer Art bekannt [73, 81, 117, 139, 144]. Insbesondere CTL nutzen GrB als Vehikel zur Transduktion von Todessignalen. Granzym B ist zur direkten Aktivierung von Caspasen befähigt [96, 151, 158]. Daneben vermittelt es über die Spaltung der BH3-Domäne (Aspartat 75) von BID pro-apoptotische Signale. Dieses BCL-2-Protein interagiert im Rahmen des mitochondrialen Signalwegs mit Bax, führt zur Freisetzung von Cytochrom c und mündet über die Aktivierung der Initiator-Caspase 9 ebenfalls in der Apoptose [134, 139]. Granzym B ist damit ein wichtiges Agens zur Einleitung der Apoptose in Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen [55].

Seine immunsupprimierenden Effekte vermittelt GrB u. a. über die Spaltung der ζ-Kette des T-Zell-Rezeptors. Indem GrB die TCR-ζ-Kette degradiert, unterbindet es Phosphorylierungsschritte, die für die Aktivierung der T-Zellen essentiell sind [85, 148]. TC-Aktivierung und -Proliferation bleiben in der Folge aus. Hierin begründet sich die immunsupprimierende Wirkung von GrB auf TC [85]. Extrazellulär wirkt sich Granzym B auf eine Vielzahl weiterer Systemkomplexe aus [54]. Laminine, Fibronectine, Vitronectine, Plasmin, Kollagentyp IV und Proteoglykane stellen u. a. Substrate von GrB dar [20, 105, 125, 162]. Damit beeinflusst GrB die Zelladhäsion, die Zellmigration und den Gewebeumbau der extrazellulären Matrix. Es wirkt ferner auf zahlreiche virale und zelluläre Proteine sowie Autoantigene. Daher kann GrB bei verschiedensten Krankheitsbildern Einfluss nehmen.

1.2.2.3 Die pathophysiologische Bedeutung von *GraB cells*

Die ersten Experimente zur GrB-Induktion in B-Zellen wurden mit B-CLL-Zellen durchgeführt. Dabei konnten B-CLL-Zellen unter Stimulation mit Interleukin 21 und synergistischer CpG- oder BCR-Aktivierung zur Produktion von GrB angeregt werden. Hierdurch konnte Apoptose in unbehandelten B-CLL-Zellen induziert werden [70]. Auch in den Tumorzelllinien HeLa und G-361 konnten *GraB cells in-vitro* den Zelltod induzieren [54]. Es erscheint daher möglich, dass *GraB cells* sowohl regressive als auch progressive Wirkungen auf Malignome haben können [85, 107].

GrB bestimmt ferner die frühe zytotoxische, antivirale Immunreaktion [56]. Gemeinsam mit IL-21 als Akute-Phase-Zytokin geht man von einer Einflussnahme von *GraB cells* auf das frühe virale Infektionsgeschehen aus [55]. Die Endstrecke bilden Apoptose und eine verlangsamte Virusreplikation [81]. So wiesen CMV-, HIV-HSV- und Denguefieber-Erkrankte in der akuten Phase ihrer Infektion erhöhte GrB-Level auf [128, 135]. Dabei ist z. B. ICP-4, ein HSV-1-Protein, ein bekanntes GrB-Substrat. Die Spaltung via GrB verhindert hier die Reaktivierung des Virus mit einem positiven Outcome für den Infizierten [78].

Neben antiviralen Funktionen vermittelt GrB auch immunsupprimierende Wirkungen. Diese können sich beispielsweise in der frühen Phase einer HIV-Infektion bemerkbar machen: NEF-abhängig erfolgt hierbei eine inkomplette TC-Aktivierung mit nachfolgender Differenzierung von BC in *GraB cells*. Über die Degradierung der TCR-ζ-Kette kommt es zu einer ausgeprägten TC-Suppression. Es besteht ein inverser Zusammenhang der Zahl IL-21-induzierter *GraB cells* und der Zahl $CD4^+$ TC. Die HIV-RNA korreliert dabei positiv mit dem Anteil an *GraB cells* [76]. Aus der TC-Hemmung, der mangelnden Antikörperproduktion und dem Verlust an B-Gedächtniszellen ergeben sich Einbußen für die Immunabwehr des Betroffenen, z. B. ein vermindertes Ansprechen auf Neoantigene und Vakzinationen. Die Inhibition der *GraB cells* eröffnet in diesem Kontext therapeutische Optionen zur Behandlung HIV-Infizierter: Zur Debatte stehen die Stimulation des CD40-Rezeptors auf B-Zellen oder des CD28-Rezeptors auf TC. Auch die Inhibition von CTLA4, GrB oder des BCR wird diskutiert.

Auch Autoimmunerkrankungen und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis weisen einen Bezug zu *GraB cells* auf. Numerische oder funktionelle Pathologien in *GraB cells* begleiten viele dieser Krankheitsbilder. Im Falle des SLE wurden beispielsweise erhöhte Spiegel für IL-21 und GrB beschrieben [53, 54].
Einen innovativen Zielpunkt regulatorischer GrB^+ B-Zellen definierte die Forschungsgruppe von Chesneau und Kollegen mit ihren Erkenntnissen zur GrB-induzierten Ausbildung einer Langzeittoleranz gegenüber Nierentransplantaten. In toleranten Empfängern war die Zahl antikörperproduzierender Plasmazellen nachweislich reduziert. Gleichzeitig verfügten sie über eine größere Zahl an GrB^+ BC. Letztere bewirken eine TC-Hemmung und können damit die beobachtete Toleranz erklären [29]. Gegenläufig wiesen Patienten chronischer Antikörper-vermittelter Abstoßung funktionelle oder numerische Breg-Defekte auf. Ein ähnliches Bild zeigt sich im Falle der Graft-versus-host-Reaktion (GvHD) bei hämatopoetischen Stammzelltransplantationen. Das Auftreten einer chronischen GvHD war von einer verminderten Anzahl an Bregs und abweichenden Signalwegen der Zytokine IL-21 und IL10 begleitet [35]. Dies impliziert eine positive Assoziation von *GraB cells* und GvHD. Zusammenfassend wird der Induktion oder Inhibition von *GraB cells* ein großes therapeutisches Potential auf dem Gebiet hyperinflammatorischer, autoimmuner, neoplastischer und viraler Erkrankungen zugesprochen. Die Infusion autologer oder HLA-gematchter allogener *GraB cells* könnte ein möglicher Therapieansatz für eine Vielzahl von Krankheitsbildern sein (s. Abbildung 2).

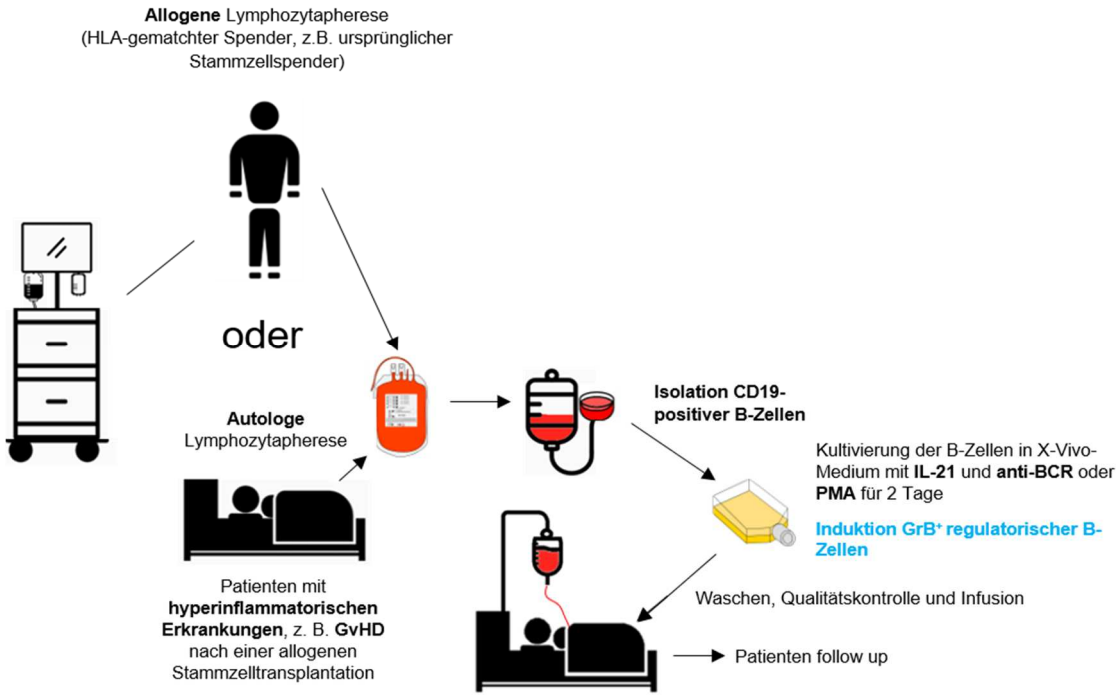


Abbildung 2 | Therapeutisches Potential Granzym B-exprimierender regulatorischer B-Zellen (*GraB cells)* zur Behandlung hyperinflammatorischer Erkrankungen: *GraB cells* können aus autologem oder allogenem, HLA (Humanes Leukozytenantigen)-gematchtem Spenderblut gewonnen werden. Im Anschluss an eine Lymphozytapherese müssen zunächst T-Zellen depletiert und B-Zellen angereichert werden. Letztere werden dann in einer Zellkultur mit Interleukin 21 und Antikörpern gegen den B-Zell Rezeptor (anti-BCR) oder Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert. Nach Durchführung entsprechender Qualitätsuntersuchungen wären so induzierte *GraB cells* im Anschluss bereit für die (Re-) Transfusion. Mögliche Einsatzgebiete wären insbesondere hyperinflammatorische Erkrankungen wie die Graft-versus-host-disease (GvHD). Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

1.2.2.4 Aktivierung der *GraB cells*

1.2.2.4.1 Stellung der BCR-Signalkaskade

Zur Generierung von *GraB cells* bedarf es einer Stimulation des BCR zusammen mit IL-21. *In-vitro* haben sich hierfür gegen den BCR-gerichtete F(ab´)$_2$-Fragmente bewährt. Diese binden an humanes CD79a, IgA, IgG, und IgM. Das eingesetzte Reagenz ist polyklonal und als humanes Zelltherapeutikum daher ungeeignet. Eine effektive Alternative für die Aktivierung und Induktion humaner *GraB cells* ist bislang nicht bekannt.

Der BCR bildet das Zentrum der BC-Aktivierung. Eine Bindung von Antigenen resultiert in der Transduktion von Signalkaskaden mit dem Endziel differenzierter und immunwirksamer BC. Die Signalkaskade des BCR bietet potentielle Angriffspunkte für alternative Wege zur Induktion von *GraB cells*: Zu Beginn der BCR-Signalgebung steht die Antigenbindung mit nachfolgender

Rezeptoraggregation. Dadurch wird die Phosphorylierung von tyrosinbasierten Aktivierungsmotiven (ITAMs) innerhalb der zytoplasmatischen Domänen von Igα und Igß durch Proteinkinasen getriggert. Hierdurch werden SH2-Bindungsstellen für die Schlüsselkinasen SYK und BtK generiert. Von besonderer Bedeutung sind deren Interaktionen mit Adaptorproteinen und hierdurch vermittelte Phosphorylierungsschritte, u. a. von BLNK. Dieses wiederum dient der Rekrutierung von Effektormolekülen wie PLCγ2 mit nachfolgender Aktivierung von *second messengern* wie IP_3 und Diacylglycerol (DAG). Für DAG sind vielzählige Transduktionswege beschrieben: Über die Proteinkinase C reguliert es zum einen die MAPK-Familie, zum anderen die NF-κB-Familie. Damit leistet DAG einen bedeutenden Beitrag zur BC-Aktivierung- und Differenzierung (s. Abbildung 4) [32].

1.2.2.4.2 Analogie zwischen Phorbol-12-myristat-13-Acetat und Diacylglycerol

Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA) ist ein Phorbolester mit einer besonderen Analogie zu DAG [103]. Als natürliches Reservoir solcher Phorbolester gelten einige Arten der Wolfsmilchgewächse und der Seidelbastgewächse [13, 41]. Es ähnelt strukturell dem tetrazyklischen Ringsystem des Diterpenalkohols Phorbol und ist an C12 mit der Fettsäure Myristat verestert. An C13 ist PMA acetyliert [42, 48, 60]. Auf diesen beiden Struktureigenschaften gründet die Ähnlichkeit des *second messengers* Diacylglycerol und PMA (s. Abbildung 3). In Abhängigkeit von der Zellart und dem umgebenden Milieu sind proliferative und antiproliferative, tumorpromovierende und antileukämische, antimikrobielle und inflammatorische Wirkungen von PMA beschrieben [132, 165]. Ein Hauptfokus von PMA in BC ist dabei die Aktivierung der Proteinkinase C. Diese gilt als Dreh- und Angelpunkt der Gentranskription und ist damit maßgebend in die BC-Aktivierung involviert. In einem mehrstufigen Stimulationsvorgehen zur Induktion regulatorischer B10-Zellen wurde PMA bereits z.T. erprobt [87]. Ein Zusammenhang von humanen *GraB cells* und PMA ist bislang nicht bekannt.

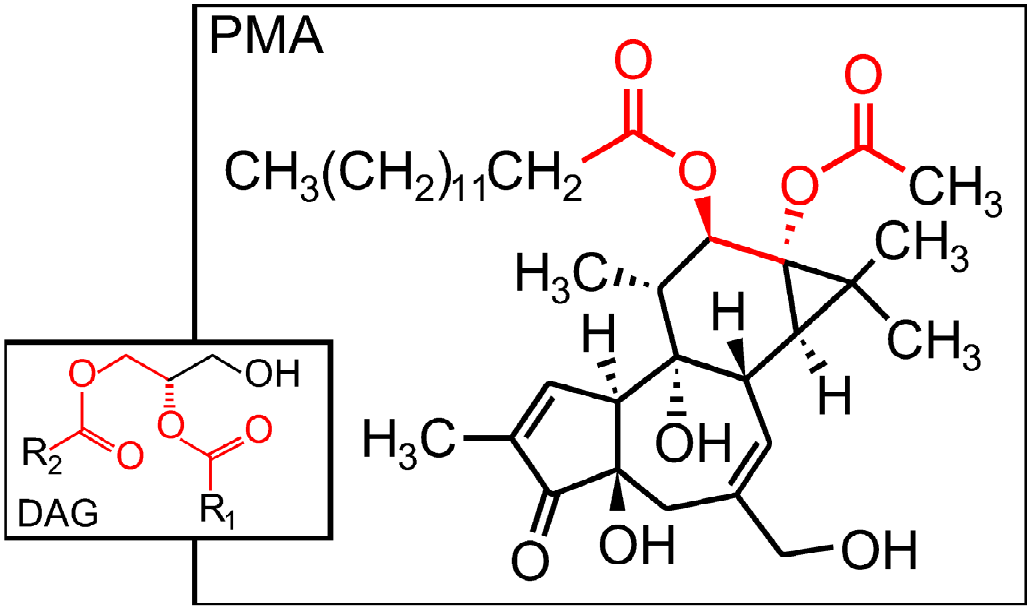


Abbildung 3 | Analogie zwischen Diacylglycerol (DAG) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA): Gegenübergestellt sind die Strukturformeln von PMA (rechts) und DAG (links). Die Strukturähnlichkeit, das Diacyl, ist in Rot hervorgehoben. R1 und R2 bezeichnen mögliche variable Fettsäure-Reste von DAG wie Palmitoyl, Arachidonoyl oder Stearoyl.

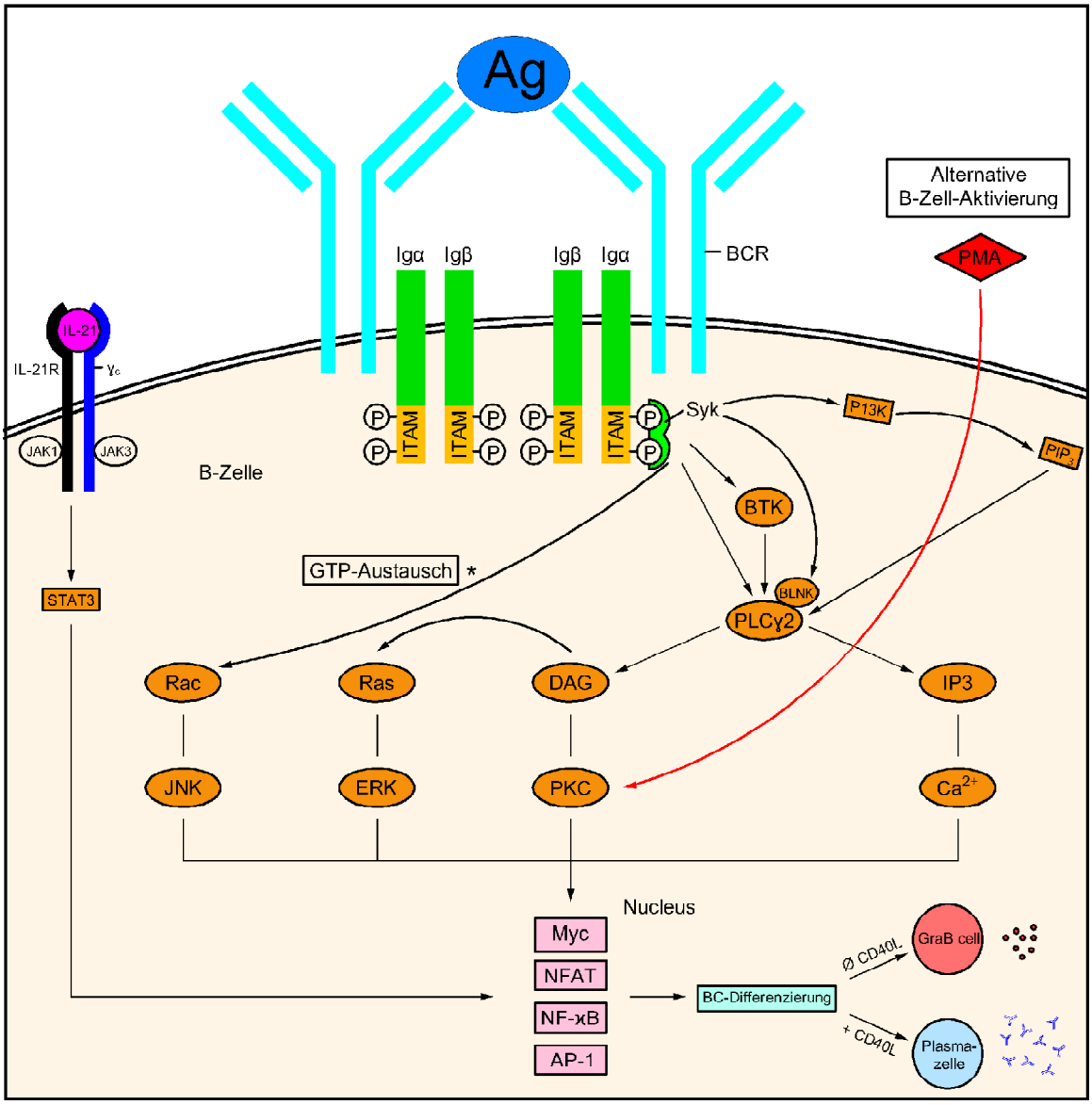


Abbildung 4 | Signalgebung des B-Zell-Rezeptors (BCR): In der Graphik ist schematisch die Signalkaskade des BCR (türkis) zur Ausbildung Granzym B exprimierender regulatorischer B-Zellen (*GraB cells*) dargestellt. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) als möglicher Induktor von *GraB cells* ist in Rot abgebildet. Die Transmembranproteine Igα und Igβ (grün) sind an die *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM) gekoppelt. Pfeile deuten die Signalkaskade beginnend mit den Kinasen *spleen tyrosine kinase* (SYK) und der Bruton-Tyrosinkinase (BTK) an. Es folgen das Adaptorprotein *B cell linker* (BLNK), die Phospholipase C gamma 2 (PLCɣ2), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PiP3) sowie die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). Weiter sind die G-Proteine *RAS* und *RAC*, die Junkinase (JNK), die *extracellular signal-related kinase* (ERK), die Proteinkinase C (PKC) sowie die Transskriptionsfaktoren *Myc*, der *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFk-B) und das *activator protein 1* (AP-1) abgebildet. Links in der Abbildung ist der Interleukin 21-Rezeptor (IL21R) mit der *common gamma chain* (blau) sowie dem *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und der Januskinase (JAK1, JAK3) dargestellt. CD40L bezeichnet den CD40-Liganden, Ag ein Antigen.

1.3 Zielsetzung

GraB cells besitzen ein großes therapeutisches Potenzial zu Behandlung einer Vielzahl autoimmuner, infektiöser und neoplastischer Erkrankungen. Ihre Wirksamkeit beruht auf der GrB-bedingten Degradation der ζ-Kette des TCR mit nachfolgender Inhibition der TC-Antwort. Eine breite Induktion von *GraB cells* kann *in-vitro* aktuell durch die Kombination von IL-21 und anti-BCR (B21) in Form polyklonaler $F(ab´)_2$-Fragmente erzielt werden. Ein Einsatz solcher Fragmente *in-vivo* würde jedoch die Gefahr unerwünschter immunogener Reaktionen bergen und verbietet sich daher für die Induktion von klinisch einsetzbaren *GraB cells*. Ein stellvertretender, gleichwertiger und GMP-konformer Induktor ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag aus diesem Grund auf der Erforschung alternativer Stimuli zur *in-vitro*-Erzeugung von *GraB cells,* mithin also der Substitution des bisher verwendeten anti-BCR. Untersucht wurden Ionomycin, LPS, Protein A, Protein G, Protein A/G, BiP, MPLA, PHA und PMA. Die Stimulanzien wurden der Positivkontrolle (B21), der Negativkontrolle (Medium), der IL-21-Kontrolle und der Isotypkontrolle ($IgG_1κ$) in durchflusszytometrischen Experimenten vergleichend gegenübergestellt. Zielparameter waren der Anteil GrB^+ BC und die Expressionsstärke von GrB.

Aufgrund der Analogie von PMA und DAG wurde die Hypothese formuliert, dass PMA ein potenter Induktor von *GraB cells* sein könnte. Es galt in diesem Kontext, die Wirkstärke des Phorbolesters und die Gesetzmäßigkeiten der BC-Differenzierung zu erforschen. Dabei sollte die optimale Kombination von PMA mit IL-21 herausgearbeitet werden und B21 vergleichend gegenübergestellt werden. Zusätzlich war der Einfluss von PMA auf die Viabilität der B-Zellen von Interesse. Daneben war es die Intention, *GraB cells* näher zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang wurden insbesondere die PMA-bedingten Veränderungen der Oberflächenexpression untersucht.

Zu guter Letzt sollte ein *in-vitro*-Modell zur Imitation einer GvHD erstellt werden, in dem der protektive Einfluss der *GraB cells* deutlich wird. Hierzu sollte die lytische Potenz von T-Zellen gegenüber spenderfremden PBMC als Endpunkt betrachtet werden. Durch Hinzugabe *in-vitro*-induzierter *GraB cells* sollte dabei die T-Zell-abhängige Lyse von PBMC reduziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 | Laborausstattung: Geräte

Geräteart	Name	Firma und Standort
Absaug-Pumpe	N010 KN.18	KNF Neuberger GmbH; Freiburg, D
Apheresebeutel	Spectra Optia® IDL-Set	TerumoBCT; Lakewood, CO, USA
Apheresesystem	Spectra Optia® Apheresis System	TerumoBCT; Lakewood, CO, USA
Durchflusszytometer	FACSScan	BD Immunzytometrische Systeme; Heidelberg, D
Elektrische Pipette	BRAND® accu-jet® pro pipette controller	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, D
Feinwaage	PJ3000	Mettler-Toledo; Columbus, Ohio, USA
Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Kühlschrank	Medicool	SANYO Electric; Moriguchi, JPN
Lichtmikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss; Oberkochen, D
Magnet-Isolations-Ständer	quadro MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D
Magnetrührer	VWR Hotplate/Stirrer	VWR International GmbH; Darmstadt, D
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5430	Eppendorf AG; Hamburg, D
Multipipette	Multipipette® M4	Eppendorf AG; Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved Brightline	LO – Laboroptik Ltd; Lancing, England
pH-Meter	744 pH Meter	Metrohm Prozessanalytik; Filderstadt, D

Pipetten	Research plus (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG; Hamburg, D
Platten-Leser	POLARStar Omega microplate reader	BMG LABTECH; Ortenberg, D
Rollschüttler	roller mixer SRT6D	stuart®; Staffordshire, UK
Plattenschüttler	IKA®-Schüttler MTS electronic	IKA Werke; Staufen im Breisgau, D
Schüttelgerät	Vortex-Genie 2	Scientific Industries; Bohemia, NY, USA
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen, D
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus Instruments GmbH; Hanau, D
Tischzentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG; Hamburg, D
Ultraschallbad	Transsonic T 310	Elma; Wetzikon, CH
Vakuum-Pumpe	Laboport® N022 AN.18	KNF Neuberger GmbH; Freiburg, D

2.1.2 Zellmaterial

Tabelle 2 | Zellmaterial: Blutprodukte

Zellmaterial	**Quelle**
Leukozyten-Apheresat	DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, D
Vollblut	Freiwillige, gesunde Spender

2.1.3 Laborbedarf

Tabelle 3 | Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Name	Firma und Standort
Chirurgische Einmalskalpelle	Surgical Disposable Scalpels	B. Braun; Melsungen, D
Einmal-Injektions-Kanüle	Sterican®	B. Braun, Melsungen, D
Einmalspritze (2ml, 5ml)	Omnifix® Luer Lock Solo	CODAN; Lensahn, D / B. Braun; Melsungen, D
Einmalspritze (1ml)	BD Plastipak™ mit Luer-Ansatz, ohne Kanüle, einzeln, steril verpackt	BD Biosciences; Heidelberg, D
Entsorgungsbeutel	Entsorgungsbeutel 200 x 300 mm	Carl Roth, Karlsruhe; D
Eppendorfgefäße (1,5 ml)	Eppendorf Safe-Lock Tubes®	Eppendorf AG; Hamburg, D
FACS Röhrchen	FALCON® Polystyrene Round Bottom Tube (5 ml)	Corning Inc.; Corning, NY, USA
Flächendesinfektion	pursept® A Xpress	Schülke & Mayr GmbH; Norderstedt, D
Handschuhe (puderfrei, latexfrei)	Peha-soft® nitrile	Hartmann; Heidenheim, D
Labortücher (weiß)	KIMTECH Science	Kimberly – Clark; Irving, TX, USA
Magnet-Trennsäulen	LS Column	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D
Multiwell Kulturplatten (96 Well Rundboden/V-Boden/Flachbodenplatten)	Nunclon Delta Surface	ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA
Na-Heparin-Röhrchen	Vacutainer®	BD Biosciences; Heidelberg, D

Pipettenspitzen (steril) 2,5 µl bzw. 10 µl	SafeSeal Tips Premium, steril	Biozym Scientific GmBH; Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen (steril) 10 µl bzw. 100 µl	uTIP Racked Pipette Tips, steril	Biotix; San Diego, CA, USA
Pipettenspitzen (steril) 1000µl	Premium Tips, steril	Biozym Scientific GmBH; Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen 50 – 1000 µl	epT.I.P.S motion Reloads	Eppendorf AG; Hamburg, D
Pipettenspitzen 2 – 200 µl	epT.I.P.S.® Standard/Bulk	Eppendorf AG; Hamburg, D
Serologische Einmalpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	FALCON® Serological	Corning Inc.; Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen 25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2 und	Nunc EasYFlasks	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Zentrifugationsröhrchen	Cellstar™- Tubes (15ml/50ml)	Greiner bio-one; Kremsmünster, AT

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Kommerzielle Puffer

Tabelle 4 | Kommerzielle Puffer

Name	**Firma und Standort**
Ampuwa®	Fresenius Kabi AG; Bad Homburg vor der Höhe, D
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Lonza Group AG; Basel, CH
autoMACS Running Buffer – MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotec GmBH; Bergisch Gladbach, D

2.1.4.2 Angesetzte Puffer

Tabelle 5 | Angesetzte Puffer

Name	Formulierung
ACK-Lysepuffer	1 l H2O 8,29 g NH4Cl 1 g KHCO3 0,037 g NaEDTA pH=7,4
MACS-Puffer	PBS (1X) 2,5 mM EDTA 0,5% HSA pH=7,4
Waschpuffer Europium-Release-Assay	20 mM HEPES 2,5 mM Probenecid 1 l PBS

2.1.4.3 Medium

Tabelle 6 | Medien

Name	Firma und Standort
X-Vivo-15 Serum-free Hematopoietic Cell Medium	Lonza Group AG; Basel, CH
RPMI 1640 + L-Glutamine	ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 7 | Chemikalien

Name	Firma und Standort
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (Na_2EDTA)	AppliChem; Darmstadt, D
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, D
EDTA	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA

2.1.6 Reagenzien und Stimulanzien

Tabelle 8 | Reagenzien und Stimulanzien

Name	Hersteller und Standort
AffiniPure F(ab')2 Fragment Goat Anti-Human IgA+IgG+IgM (H+L) (anti-BCR)	Jackson Immuno Research; West Grove, PA, USA
BATDA Reagent	PerkinElmer; Waltham, MA, USA
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH; Berlin, D
Brefeldin A	BioLegend; San Diego, CA, USA
CD40-Ligand	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
DELFIA® Europium Solution	PerkinElmer; Waltham, MA, USA
DELFIA® Lysis Buffer	PerkinElmer; Waltham, MA, USA
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Dynabeads® Human-T-Activator CD3/CD28	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
FCR Blocking Reagent, Human	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D

Gamunex® 10% Infusionslösung	Grifols Deutschland GmbH; Frankfurt, D
HEPES	AppliChem; Darmstadt, D
Human Albumin, 20%	DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen; Ulm, D
Ionomycin	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
LPS	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Monophosphoryl Lipid A (Synthetic) (PHAD®)	Avanti Polar Lipids, Inc.; Alabaster, AL, USA
Nemo Binding Peptide II	EMD Millipore Corp.; Billerica, MA, USA
Phorbol-12-myristat-13-Acetat powder	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Phytohämagglutinin	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Pierce Ig Binding Proteins (Protein A, G, A/G)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Probenecid, 98 %	Alfa Aesar; Kandel, D
Protein A – Sepharose™ Rekombinantes Protein G – Sepharose™	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Protein A/G-Sepharose ®	Abcam; Milton, UK
Recombinant human GRP78 BiP protein	Abcam; Milton, UK
Recombinant human IL-21, premium grade	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D
Staurosporin	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Biochrom GmbH (Merck); Berlin, D

2.1.7 KITS

Tabelle 9 | KITS

Name	Firma und Standort
Pan T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D
CliniMACS CD19	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D
OncoImmunin® Inc PanToxiLux Kit	OncoImunin Inc; Rockville, MD, USA
OncoImmunin® Inc GranToxiLux Kit	OncoImunin Inc; Rockville, MD, USA

2.1.8 Antikörper und Fluorochrome

Tabelle 10 | Antikörper und Fluorochrome

Antikörper	Klon	Isotyp	Konjugat	Hersteller
CD3	HIT3a	Mouse IgG_{2a} κ	PE, FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD3	UCHT1	Mouse IgG_1 κ	PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD5	UCHT2	Mouse BALB/c IgG_1, κ	PE-Cy5, FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD8	RPA-T8	Mouse IgG_1 κ	PE, PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD14	M5E2	Mouse IgG_{2a} κ	FITC, PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD14	61D3	Mouse/IgG_1 κ	PE-Cy5	Thermo Fisher, Scientific; Waltham, MA, USA
CD19	HIB19	Mouse IgG_1, κ	FITC	Biolegend; San Diego, California, USA
CD19	HIB19	Mouse IgG_1 κ	PE, PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD20	2H7	Mouse IgG_{2b}, κ	FITC, PE, PE/Cy5	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD20	2H7	Mouse BALB/c IgG_{2b}, κ	PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA

CD25	M-A251	Mouse BALB/c IgG_1, κ	FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD38	HIT2	Mouse IgG_1, κ	FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD45	HI30	Mouse IgG_1 ϰ	FITC, PE, PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD71	M-A712	Mouse BALB/c IgG_{2a}, κ	FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD80	L307.4	mouse C3H/Bi IgG_1, ϰ	FITC, PE, PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD83	HB15e	mouse IgG_1, ϰ	FITC, PE, PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD86	2331 (FUN-1)	Mouse BALB/c IgG_1 ϰ	FITC, PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD147	HIM6	Mouse IgG_1, ϰ	FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD274	MIH1	Mouse BALB/c IgG_1, ϰ	FITC	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
HLA-A, B, C	G46-2.6	Mouse IgG_1, ϰ	PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
HLA-DR	Immu 357	Mouse IgG_1	FITC	Beckman Coulter; Brea, CA, USA
HLA-DR	TU36	Mouse IgG_{2b}, ϰ	PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
IgM	G20-127	Mouse IgG_1, ϰ	PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
CD1d	F10/21a 3	Mouse IgG_1, ϰ	PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
Anti-human Granzym B	GB11	Mouse BALB/c IgG_1, κ	PE	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
Isotyp-kontrolle	MOPC-21	IgG1, ϰ	PE, PE-Cy5	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
Isotyp-kontrolle	S43.10	IgG2α, ϰ	FITC	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, D

Multimix CD8/4/3	DK25/M T310/U CHT1	IgG1, κ	FITC/PE/ PE-Cy5	Dako, Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA

2.1.9 Software

Tabelle 11 | Software

Name	Version	Firma und Standort
FlowJo	10.6.1	Tree Star, Ashland, Oregon, USA
Microsoft Office, Word, Excel	16.16.14	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism	8.4.3	GraphPad Software Inc.; San Diego, California, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Ethikvotum

Die vorliegende Arbeit untersteht dem Forschungsprojekt zur „Modulation und immunologische(n) Bedeutung von *GraB cells*, einem neuen Typ humaner regulatorischer B-Zellen – Gesunde Probanden“. Dieses wurde am 07.09.2015 von der Ethikkommission der Universität Ulm gemäß Antrag Nr. 265/15 genehmigt. Der Antrag erlaubt die Durchführung wissenschaftlicher Untersuchungen an peripherem Spenderblut gesunder Probanden.

2.2.2 Zellisolationen

Ausgangsmaterial zur Isolation von PBMC, B-Zellen und T-Zellen waren Leukozytapheresate oder peripheres Vollblut. Eine genaue Zuordnung der Versuche zum verwendeten Blutprodukt findet sich im Anhang.

2.2.2.1 PBMC-Isolation aus Vollblut

Das Verfahren der PBMC-Isolation basiert auf der Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde heparinisiertes Vollblut freiwilliger Spender 1+1 mit PBS verdünnt und zur Ausbildung zweier Phasen senkrecht auf die Trennlösung FICOLL (Verhältnis 3:1) geschichtet. Entlang des durch FICOLL erzeugten Saccharosegradienten bildeten sich unter 15-minütiger Zentrifugation bei 1000 g, 20 °C und ausgeschalteter Bremse, Banden unterschiedliche Dichte aus: Das Trennmedium besitzt eine Dichte von 1078 g/ml. Charakteristischerweise lagerten sich die Erythrozyten und Granuolzyten mit ihrer höheren Dichte darunter ab. Dem Trennmedium aufgelagert war ein Ring aus PBMC und Thrombozyten (Dichte < 1078 g/ml), gefolgt von Blutplasma. Diese Auftrennung ermöglichte die Abnahme der PBMC mit nachfolgender 1+1 Verdünnung via PBS. Im Anschluss an einen Waschschritt bei 400 g, 4 °C, für 10 Minuten wurden die Zellmassen gepoolt und erneut gewaschen (200 g, 20 °C, 15 Minuten). Zur Eliminierung verbliebener Erythrozyten wurden die Zellen in 4 ml ACK-Lyse-Puffer aufgenommen und für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mittels PBS abgebrochen. Es folgten ein Waschschritt (400 g, 4 °C, 10 min) und die Zählung der PBMC in der Neubauer Zählkammer.

2.2.2.2 PBMC-Isolation aus Leukapheresat

Alternativ konnten PBMC aus Leukapheresaten isoliert werden. Diese enthalten extrakorporal gewonnene Leukozyten und Blutplasma. Zur Antikoagulation wurde das Apheresat in Beuteln gesammelt, denen ACD-A zugesetzt war. Im Vorfeld der Isolation wurde das Apheresat für eine Stunde bei 350 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde es unter sterilen Bedingungen auf die Zentrifugengefäße verteilt, 1+2 verdünnt und gewaschen. Die Isolation selbst wurde parallel zu 2.2.2.1. durchgeführt, beginnend auf der Ebene der Erythrozytenlyse. Aufgrund der hohen Zellzahl wurde das doppelte Volumen an ACK-Lyse-Puffer verwendet. Die isolierten PBMC stellten den Ausgangspunkt für weitere Zellisolationen dar.

2.2.2.3 B-Zell-Isolation

Die B-Zell-Isolation folgt einer Positivselektion des Magnetic Activated Cell Sortings: Die Zielzellen (BC) werden hierbei magnetisch markiert und mithilfe eines Magnetfeldes selektioniert. Im Vorfeld dieser BC-Isolation wurden die isolierten PBMC gewaschen (400 g, 4 °C, 7 min) und in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Zur Markierung der BC wurde den PBMC das CD19 Reagent zugesetzt, das aus CD19-Antikörpern besteht, die an Eisen-Dextran gekoppelt sind. Via Antigen-Antikörper-Bindung markiert es so die B-Zellen magnetisch. 1,5 µl des Reagens waren für $1x10^6$ $CD19^+$ BC ausgerichtet. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (350 rpm) inkubiert. Die gelabelten Zellen wurden anschließend zwei Mal in MACS-Puffer gewaschen und in einem Volumen von 5 ml aufgenommen. Parallel dazu wurde die Magnetsäule des QuadroMACS™ Separator vorgewaschen. Nun wurden die Zellen auf die Magnetsäule geträufelt. Eine Säule ist für maximal $2x10^9$ Zellen ausgerichtet. Bei der Passage der PBMC durch die Magnetsäule verblieben die markierten B-Zellen im Magnetfeld der Säule. Die Negativfraktion wurde ausgeschieden und verworfen. Im Anschluss daran wurde die Säule drei Mal mit je 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Die Säule wurde schließlich aus der Halterung gelöst und die Positivfraktion (BC) abgestempelt. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde dieser Prozess mit einer zweiten Säule wiederholt. Zum Schluss wurden die B-Zellen in der Neubauer Zählkammer mittels einer Färbung mit Trypanblau gezählt.

2.2.2.4 T-Zell-Isolation

Die T-Zell-Isolation fußt auf einer Negativselektion: Primäre Biotin-gekoppelte Antikörper markieren alle Nicht-T-Zellen. Ferromagnetische Anti-Biotin-Microbeads binden sekundär an diese Antikörper und ermöglichen so die magnetische Auslese. Im Detail wurden die isolierten PBMC zunächst in MACS-Puffer gewaschen. Dafür wurde eine Zentrifugationszeit von sieben Minuten bei 400 g und 4 °C gewählt. Dann wurden die PBMC in 40 µl MACS-Puffer pro 10^7 PBMC resuspendiert. Im Folgenden wurden die Primärantikörper hinzugegeben: Vom sogenannten Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail benötigte man 10 µl je 10^7 PBMC. Zur Erhöhung der Reinheit wurden die PBMC in ein neues Zentrifugations-Röhrchen überführt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für fünf Minuten. Bezogen auf 10^7 PBMC wurden anschließend 30 µl MACS-Puffer hinzu pipettiert. Zum Abschluss der Markierung mussten die Sekundärantikörper hinzugegeben werden. Dazu waren 20 µl Pan T Cell Microbead Cocktail pro 10^7 PBMC nötig. Nach sorgfältiger Durchmischung erfolgte eine Inkubation für zehn Minuten bei 4 °C. Damit waren, mit Ausnahme der TC, alle Zellen magnetisch gelabelt und wurden für die Isolation auf eine vorgewaschene Säule des QuadroMACS™ Separators gegeben. Unterhalb der Säule war ein Auffang-Behälter für die Negativfraktion angebracht. Da die T-Zellen nicht magnetisch markiert worden waren, durchwanderten sie die Säule und gelangten in das Auffang-Gefäß (Negativfraktion). Im Gegensatz dazu verblieben die markierten Nicht-T-Zellen in der Magnetsäule. Nachdem die komplette Zellmasse durchgetropft war, wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer nachgewaschen und verworfen. Dann wurden die isolierten T-Zellen gewaschen (400 g, 5 min, 4 °C). Das Magnetic Activated Cell Sorting wurde zur Erhöhung der Reinheit mit einer zweiten Säule wiederholt und die Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt.

2.2.3 Zellkultur und Zellstimulation

Die B-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit in 96-Well-Rundboden-Kulturplatten kultiviert. Dazu wurde X-vivo-15 als Nährmedium verwendet. Die gewählte Zell-Konzentration betrug $1x10^6$ Zellen/ml bei einem Volumen von 200 µl pro Well. Die Inkubationszeit umfasste 48 h. Zur Generierung der *GraB cells* diente IL-21 als Basisreagenz. Die Standardkonzentration war auf 100 ng/ml festgelegt.

2.2.4 Durchflusszytometrische Färbungen

2.2.4.1 Prinzip des fluorescence-activated cell sortings

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen. Die Methode beruht auf der Fluoreszenz: Mittels monochromatischem Laserlicht erfolgt die Anregung der Elektronen von Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Die anschließende Emission von Photonen erlaubt unter Rückkehr auf das Ausgangsniveau eine Aussage über die Zahl gebundener Antikörper. Das verwendete FACSScan ermittelt drei unterschiedliche Fluorophore: FITC (Ex-Max 494 nm / Em-Max. 518 nm), PE (Ex-Max 565 nm / Em-Max. 575 nm) und PE-Cy5 (Ex-Max. 650 nm / Em-Max. 670 nm). Am FACS CANTO II wurde zusätzlich der Farbstoff APC (Ex-Max 650 nm / Em-Max 660 nm) gemessen. Die Farbstoffe weisen Schnittstellen in ihren Emissionsspektren auf. Dies prädisponiert für die Erfassung falsch doppelt positiver Populationen. Unter Verwendung mehrerer Farbstoffe mussten deshalb für die korrekte Zuordnung von Signal und Farbstoff Kompensationsproben eines jeden Farbstoffs angefertigt werden. Ebenso wurde eine ungefärbte Kompensationsprobe erstellt und in das FACS-Gerät eingelesen. So konnte eine rechnerische Korrektur der Überschneidungen erfolgen.

2.2.4.2 Oberflächenfärbung

Um die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern zu versehen, wurden die Zellen als Erstes in FACS-Tubes überführt. Als nächstes wurden die Antikörper zur Zellprobe hinzugegeben. 1 µl der Antikörper war für 100 µl Zellsuspension vorgesehen. Für eine umfassende Durchmischung wurden die Proben gevortext und nachfolgend für 15 min bei RT inkubiert. Nach Durchführung eines Waschschrittes mit 2 ml PBS pro FACS-Tube (400 g, 5 min, 4 °C) und Abnahme des Überstandes waren die Zellen messbereit.

2.2.4.3 Intrazelluläre Färbung

Zur Detektion intrazellulären GrBs musste in einem ersten Schritt eine Akkumulation von GrB erzeugt werden: Dazu wurde die Proteinsekretion mittels Brefeldin A in einer Konzentration von 1 µg/ml je Well verhindert. Darauffolgend inkubierten die Zellen für vier Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2, 100 % Luftfeuchtigkeit). Anschließend wurden die Zellen in FACS-Tubes überführt und gewaschen (4 °C, 400 g für 5 min). Nachfolgend konnte eine Oberflächenfärbung für FITC und PE-Cy5 im Verhältnis 1:100 durchgeführt werden (s. 2.2.4.2). Als nächstes wurde das BC-Gerüst mit 100 µl Cytofix je Probe fixiert. Im Zuge dessen fanden eine 15-minütige Inkubation bei RT und ein Waschschritt (400 g, 4 °C, 5 min) statt. Damit die fluoreszenzmarkierten Antikörper die BC-Membran überwinden konnten, mussten Lipid- und Proteinkomponenten der Membran gelöst werden. Dazu wurden jeweils 100 µl Cytoperm™ je Probe hinzu pipettiert. Dieses wurde im Vorfeld 1:100 mit destilliertem Wasser vorverdünnt. Weiter gab man 2 µl FCR-Rezeptorblock je FACS-Tube hinzu, vortexte die Proben und inkubierte sie für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Dann wurden gegen GrB gerichtete Fluoreszenz-Antikörper in PE im Verhältnis 1:100 hinzugegeben. Nach sorgfältiger Durchmischung und anschließender 30-minütiger Inkubation im Kühlschrank (4 °C, dunkel) war die intrazelluläre Färbung abgeschlossen und die durchflusszytometrische Messung konnte gestartet werden.

2.2.4.4 Auswertung

2.2.4.4.1 Gating

Die Fluoreszenzsignale konnten mit der Flow Jo Software in Diagrammen veranschaulicht werden. Mit Histogramm, Dot plot, zebra plot, density plot und heat map plot ist eine Vielzahl an Darstellungsformen gegeben. Der übliche Modus zur morphologischen Auswertung der Ergebnisse ist die Betrachtung des Pseudocolor-Plots. Ein Punkt repräsentiert eine Zelle. Seitwärtsstreulicht und Vorwärtsstreulicht liefern Aussagen über Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht). Mithilfe von Gates wurden Zellpopulationen morphologisch definiert, abgegrenzt und genauer analysiert. Daneben wurde die *medium fluorescence intensity* (MFI) betrachtet.

2.2.4.4.1.1 Bestimmung der Viabilität und Reinheit

Zu Beginn der Auswertung der Flow Jo-Daten stand die Bestimmung viabler Zellen. Hierzu wurde ein morphologisches Viabilitätsgate ermittelt: Spiegelpopulationen dienten in diesem Kontext als tragendes Indiz zur Abgrenzung toter Zellen. Sie zeichneten sich ferner durch geringere SSC (Seitwärtsstreulicht)- und FSC (Vorwärtsstreulicht)-Werte aus und stellten sich am linken Diagrammunterrand dar. Innerhalb eines Versuchs wurde für alle Proben möglichst das gleiche morphologische Viabilitätsgate verwendet. Zellkultivierung, Stimulation und Fixierung konnten die definitive Abgrenzung viabler Zellen erschweren. In diesem Fall einigte man sich unter Zusammenschau der Kontrollproben (B21, IL-21, Isotyp) auf ein einheitliches Gate. Nach Ermittlung der Viabilität konnten die prozentualen Anteile gefärbter Oberflächenmarker analysiert werden. Zur Ermittlung der Reinheit wurde innerhalb der viablen Zellpopulation der SSC gegen CD20 aufgetragen. Die $CD20^+$ Zellpopulation repräsentierte den BC-Anteil und damit die Reinheit der Probe.

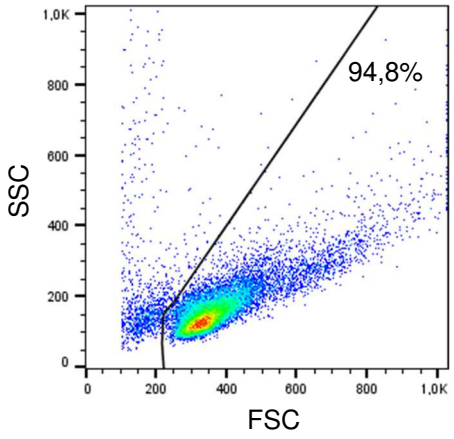


Abbildung 5 | Ermittlung der Viabilität mittels Flow Jo: Am linken Bildrand grenzt sich eine Spiegelpopulation niedriger Granularität (Side Scatter, SSC) und Größe (Forward Scatter, FSC) ab. Diese Zellen repräsentieren tote Zellen. Das morphologische Viabilitätsgate umfasst die viablen Zellen in der rechten Bildhälfte (hier: 94,8 %).

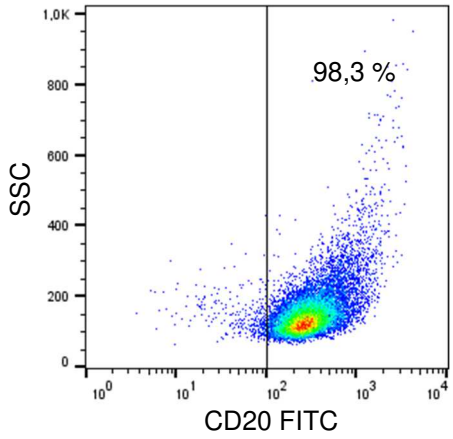


Abbildung 6 | Ermittlung der Reinheit mittels Flow Jo: Ausgehend von der viablen Zellpopulation (Abbildung 5) wurde ein CD20-positives Gate im Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-Kanal ermittelt. Positiv gewertet wurden Zellen mit einem Fluoreszenzsignal ≥ 10^2. Die $CD20^+$ Population gibt die Reinheit der B-Zellen wieder (hier: 98,3 %). Auf der Y-Achse ist der Side Scatter (SSC) aufgetragen.

2.2.4.4.1.2 Definition GrB⁺ Zellen

Der Prozentsatz GrB-positiver B-Zellen an der Gesamtzahl der BC ergab sich aus der Analyse der Negativkontrolle, Isotypkontrolle und Positivkontrolle: Als Positivkontrolle diente die zeitgleiche Stimulation mit IL-21 und anti-BCR (B21). In dieser Probe war der maximale Anteil an *GraB cells* zu erwarten. Die *GraB cells* grenzten sich als stark GrB⁺ Population in der rechten Diagrammhälfte ab. Die Negativkontrolle beinhaltete dagegen gänzlich unstimulierte B-Zellen. In ihr waren somit keine GrB⁺ Zellen zu erwarten. Die Isotypkontrolle diente dem Ausschluss unspezifischer Bindungen. Das GrB⁺ Gate wurde morphologisch so gesetzt, dass folgende Kriterien erfüllt waren: In der Negativkontrolle und der Isotypkontrolle schloss das Gate idealerweise weniger als 1% GrB⁺ Zellen ein. In der Positivkontrolle wurde darauf geachtet, dass das Gate die sich abgrenzende Population möglichst vollständig umfasste. Das ermittelte GrB-Gate wurde schlussendlich unverändert auf alle Zellproben eines Versuchs übertragen.

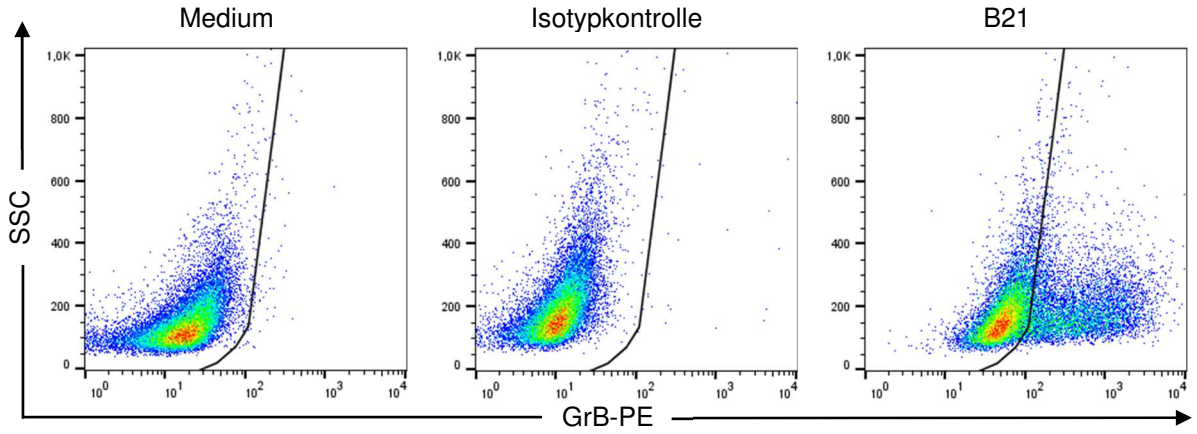


Abbildung 7 | Definition Granzym B (GrB)-exprimierender B-Zellen: Dargestellt ist expemplarisch das Experiment V28. B-Zellen wurden hierbei aus einem Leukozytapheresat isoliert und für 48 h stimuliert. Die Negativkontrolle beinhaltete unbehandelte Zellen. Die Positivkontrolle unterlag einer Stimulation mit anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell Rezeptor) und Interleukin 21 (B21). Die Isotypkontrolle wurde ebenfalls mit B21 stimuliert. Es folgte die intrazelluläre GrB-Färbung mit gegen GrB gerichteten Fluoreszenz-Antikörpern in Phycoerythrin (PE). Die Isotypkontrolle wurde mit anti-IgG_1-k behandelt. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch mit dem FACSScan, die Auswertung anschließend mit der Flow Jo-Software. Dargestellt sind von links nach rechts die Pseudocolor Plots der Negativkontrolle (Medium), der Isotypkontrolle und der Positivkontrolle. Auf der Y-Achse ist der Side Scatter (SSC) aufgetragen, auf der X-Achse der PE-Kanal mit den GrB-positiven Signalen (GrB-PE). Das Gate wurde so gewählt, dass in der Negativ- und Isotypkontrolle der Anteil Granzym B-exprimierender B-Zellen (*GraB cells*) ≤ 1% war. In der Positivkontrolle grenzten sich *GraB cells* mit Werten > 10^2 ab.

2.2.5 PanToxiLux-Assay

Das Ziel des PanToxiLux-Assays, durchgeführt mit dem PanToxiLux Kit der Firma OncoImunin Inc, bestand in der durchflusszytometrischen Erfassung der Zytotoxizität von TC als Effektorzellen. Gemessen wurde die Aktivierung von Caspasen und GrB in Anwesenheit allogener PBMC (= Targetzellen) anhand der Umsetzung eines fluoreszierenden Substrats *PS*. Der Assay sieht zur Abgrenzung von Effektorzellen und Targetzellen eine sogenannte TFL4-Färbung vor. Als vergleichende Maximallyse diente eine mit dem Proteinkinasehemmer Staurosporin (5 µg/ml) behandelte Targetzellprobe. Als Spontanlyse fungierte eine unbehandelte Targetzellprobe. Gemäß den Hersteller-Angaben sollte die Spontanlyse dabei die 30 %-Grenze nicht überschreiten. Die Voraussetzung Spontanlyse < Spezifische Lyse < Maximallyse musste für verlässliche Daten gegeben sein. In den durchgeführten Versuchen lag die Spontanlyse im Mittel bei 32,9 %, die spezifische Lyse bei 45,1 % und die zugehörige Maximallyse bei 96,75 % (s. Abbildung 8).

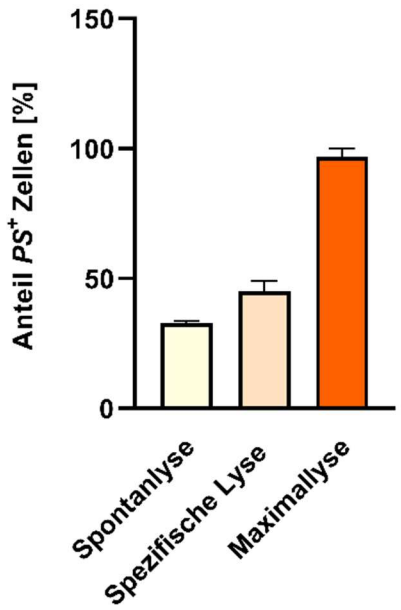


Abbildung 8 | Gegenüberstellung der Apoptoserate von Spontanlyse, Maximallyse und Spezifischer Lyse: Exemplarisch sind die gemittelten Anteile apoptotischer Zellen (*PS*$^+$) der Spontanlyse, der Maximallyse und der spezifischen Lyse aus V32 und V34 (s. Anhang) dargestellt. Die Spontanlyse beinhaltete unbehandelte Targetzellen (periphere mononukleäre Blutzellen, PBMC), der Maximallyse war Staurosporin beigefügt (5 µg/ml). Die spezifische Lyse enthielt Targetzellen (PBMC) und Effektorzellen (T-Zellen) im Verhältnis 1:50. Hierzu inkubierten isolierte T-Zellen zunächst mit T-Zell-Aktivator für 2 d. Danach erfolgte die Isolation der Targetzellen mit anschließender zweistündiger Koinkubation der beiden Zellreihen. Im Anschluss daran wurde der PanToxiLux-Assay durchgeführt. Zur Abgrenzung der Targetzellen wurden diese mit dem Lineage-Cocktail gefärbt. Das Caspasesubstrat *PanCyToxiLuxTM Substrate* (*PS)* färbte den Anteil apoptotischer Zellen. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Abgebildet sind Mittelwerte aus n = 2 Versuchen. Fehlerbalken repräsentieren den *standard error of the mean*.

2.2.5.1 Durchführung des Assays mittels TFL4-Färbung

Zur Durchführung des Assays präparierte man zuerst die Effektorzellen: TC wurden gemäß 2.2.2.4. isoliert und mit einem gegen CD3/CD28 gerichteten T-Zell-Aktivator stimuliert (1 µl/ml). Die Effektorzellen inkubierten darauffolgend 24 h im Brutschrank in Rundbodenplatten. In diesem Zeitfenster bereitete man die Targetzellen vor. Im Anschluss an die PBMC-Isolation (2.2.2.1.) erfolgte ein Waschschritt (400 g, 4 °C, 5 min). Als nächstes fand die TFL4-Färbung statt: Dazu wurde das Zellpellet in einer Konzentration von $2x10^6$ PBMC/ml in RPMI Medium aufgenommen. Letzterem war TFL4 nach Herstellerangaben zugesetzt worden. Es folgte eine einstündige Inkubation der TFL4-gefärbten Targetzellen im Brutschrank bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen (400 g, 4 °C, 5 min) in der 10-fachen Menge RPMI-Medium wurde eine Konzentration von $1x10^6$ PBMC/ml eingestellt.

Für die Co-Kultivierung der Target- und Effektorzellen wurden verschiedene Verhältnisse von Effektor- zu Target-Zellen pipettiert (6:1; 12:1; 25:1 und 50:1). Die Zellen wurden gewaschen (400 g, 4 °C, 5 min) und in je 35 µl *PS* aufgenommen. Letzteres diente als Indikator des Zelltodes. Nach einem einminütigen Waschgang bei 400 g und 4 °C konnten die Zellen schließlich für 2h im Brutschrank co-inkubieren. Abschließend führte man eine Oberflächenfärbung der T-Zellen mit CD3 (PE) durch und erfasste die Zellen durchflusszytometrisch. Signale der Zelllyse waren im FITC-Kanal zu erwarten.

2.2.5.2 Zellabgrenzung anhand eines Lineage-Cocktails

Zur besseren Differenzierung von Target- und Effektorzellen wurde ein sogenannter Lineage-Cocktail anstelle von TFL4 verwendet. Dieser enthielt CD14, CD19, CD20, CD1c und CD11c in PE. Er sollte alle Zellen mit Ausnahme von TC und NK-Zellen färben. Die Targetzellen wurden dementsprechend als allogene PBMC ohne TC und NK-Zellen definiert. Zusätzlich wurden folgende Modifikation gegenüber 2.2.5.1 vorgenommen: Im Anschluss an die Präparation der Effektorzellen (2.2.5.1) erfolgte eine zusätzliche Koinkubation der TC mit den PBMC. Diese hatte eine umfassende Entfaltung des zytotoxischen Potentials der TC zum Ziel, sie betrug 24 h. Parallel zum Vorgehen aus 2.2.5.1. wurden die Proben in 35 µl *PS* resuspendiert und 2 h im Brutschrank koinkubiert. Abschließend erfolgte die Oberflächenfärbung (2.2.4.2) mit dem Lineage-Cocktail in PE und CD3 in APC. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch.

2.2.5.3 Auswertung

2.2.5.3.1 Gating-Strategie TFL4$^+$ Zellen

Wurde zur Abgrenzung der Zellen eine TFL4-Färbung verwendet (2.2.5.1), so hatte die Ermittlung der Targetzellen mit einem TFL4-positiven Gate zu erfolgen. TFL4-Signale waren im APC-Kanal vorgesehen. Um den Anteil lysierter Targetzellen zu erhalten, wurde auf eine TFL4$^+$PS$^+$ Fraktion gegatet. Das *PS*-Gate wurde unter Zuhilfenahme der Maximallyse gesetzt. In Ermangelung einer eindeutigen Unterscheidung von Effektorzellen und Targetzellen mittels TFL4, wurde auf den Lineage Cocktail ausgewichen (s.u.).

2.2.5.3.2 Gating Strategie LIN$^+$ Zellen

Zur Bestimmung der Targetzellen wurde eine CD3$^-$LIN$^+$PS$^+$ Zellpopulation gegatet. Als Orientierung dienten die angefertigten Kompensationsproben der einzelnen Zellreihen: Als erstes bestimmte man in der TC-Probe ein CD3$^+$ Gate und übertrug es auf die Versuchsproben. Im Umkehrschluss konnte damit die CD3$^-$ Fraktion ermittelt werden. Als nächstes grenzte man in der PBMC-Kontrollprobe die LIN$^+$-Fraktion ab (Targetzellen) und übertrug jenes Gate auf die CD3$^-$ Population der Versuchsprobe. In einem letzten Schritt betrachtete man mit Staurosporin behandelte und damit tote TC, um ein *PS*$^+$ Gate zu setzen. Dieses schloss die apoptotischen Zellen ein. Es wurde auf die CD3$^-$LIN$^+$ Fraktion übertragen. Damit erhielt man den prozentualen Anteil lysierter Zellen.

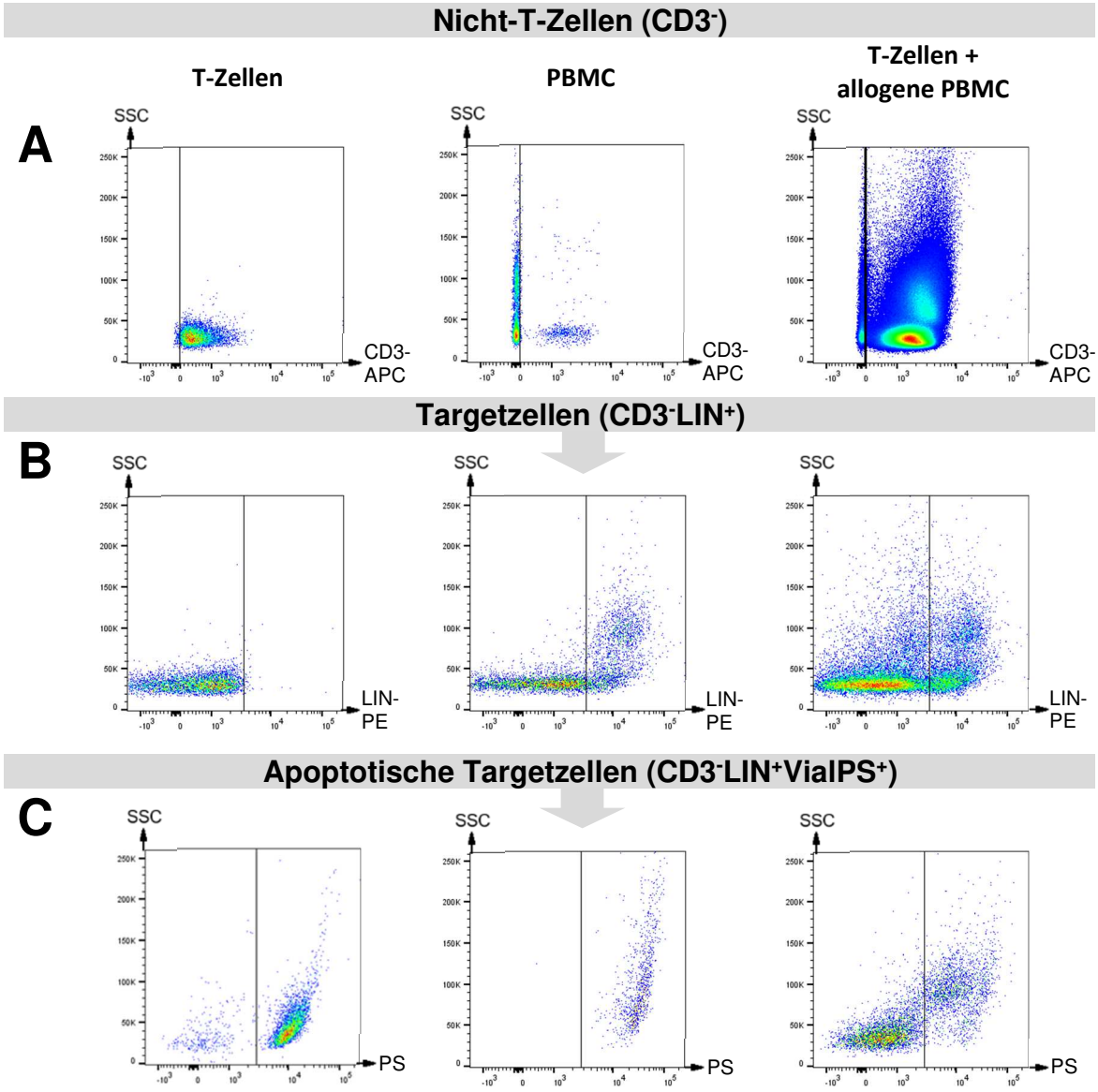


Abbildung 9 | Gating Strategie im PanToxiLux-Assay: Dargestellt sind Pseudocolor-Plots aus Versuch 30 (s. Anhang). Die erste Spalte zeigt die T-Zell (TC)-Proben, die zweite Spalte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) und die dritte Spalte die Versuchsproben mit Effektor- und allogenen Targetzellen. **A:** Auf der Y-Achse ist der SSC aufgetragen, auf der X-Achse CD3-Signale im Allophycocyanin (APC)-Kanal. Anhand der Positivkontrolle (TC) wurde ein CD3-negatives Gate ermittelt und auf die Versuchsprobe und die PBMC-Probe übertragen. Die Negativfraktion war als Zielpopulation zu werten. **B:** In einem zweiten Schritt wurde die definitive Targetzell-Population innerhalb der $CD3^-$-Negativfraktion abgegrenzt ($CD3^-LIN^+$). Das Gate wurde in der PBMC-Kontrolle im Phycoerythrin (PE)-Kanal mithilfe des Lineage Cocktails (LIN) bestimmt. Es wurde so gewählt, dass die TC-Probe möglichst wenige LIN^+ Zellen (≤ 1 %) beinhaltete. Dieses Gate wurde ebenfalls auf die Versuchsprobe transferiert. So erhielt man schlussendlich eine $CD3^-LIN^+$ Population. **C:** In einem letzten Schritt wurde im Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-Kanal diejenige Fraktion bestimmt, die das *PanCyToxiLuxTM Substrate* (PS) exprimierte. Letzteres spiegelte den Anteil lysierter Targetzellen wider. Es wurde auf der Basis mit Staurosporin behandelter Positivkontrollen (TC, PBMC) ermittelt.

2.2.6 Europium-Release-Assay

Mit dem Europium-Release-Assay wurden zwei Zielpunkte verfolgt. Zum einen der Nachweis der Zytotoxizität von TC gegenüber spenderfremden PBMC, zum anderen die Demonstration des regulatorischen Einflusses von *GraB cells*. Der Assay beruht auf der Fixierung eines Bis(acetoxymethyl)-2,2′:6′,2″-terpyridine-6,6″-dicarboxylate-Esters (BATDA) in den Targetzellen mittels Hydrolyse zu TDA. Lysieren Effektorzellen ihre Targetzellen, so wird TDA freigesetzt, das mit Europium einen fluoreszierenden Chelat-Komplex ausbildet. Deren Signale werden als *time resolved fluorescence* (zeitaufgelöste Fluoreszenz, TRF) mithilfe des POLARstar-Readers erfasst und geben Aufschluss über den Anteil lysierter Targetzellen. Zur Generierung verlässlicher Daten sollte die Spontanlyse die 30%-Grenze nicht überschreiten. Die Spontanlyse enthielt unbehandelte Targetzellen, die Maximallyse enthielt mit Lysepuffer behandelte Targetzellen. Die spezifische Lyse setzte sich aus Target- und Effektorzellen zusammen. Letztere hatte sich für verlässliche Daten zwischen Spontanlyse und Maximallyse einzuordnen.

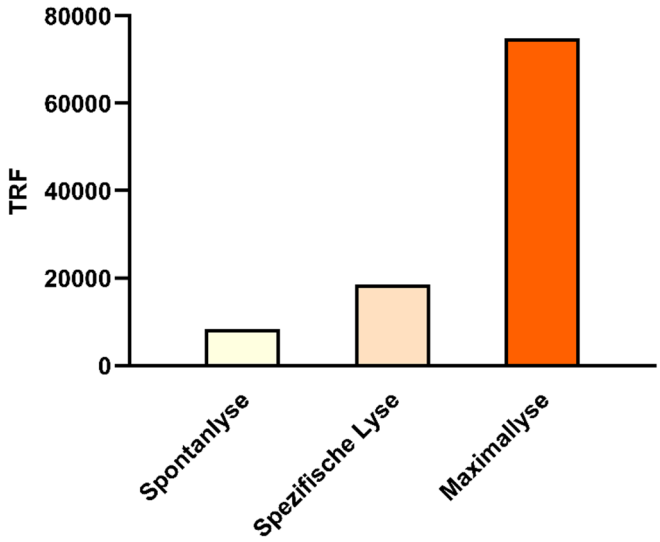


Abbildung 10 | Gegenüberstellung von Spontanlyse, Spezifischer Lyse und Maximallyse im Europium-Release-Assay: T-Zellen (Effektorzellen) wurden isoliert und mit einem gegen CD3/CD28 gerichteten Aktivator inkubiert. Am Folgetag wurden allogene periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) als Targetzellen isoliert. Es folgten eine Koinkubationszeit der beiden Zellreihen von 2 h und der Europium-Release-Assay. Exemplarisch sind die Absolutwerte der *time resolved fluorescence* (TRF) aus V46 (n = 1; s. Anhang) dargestellt. Die Spontanlyse enthielt unbehandelte Targetzellen, die Zellen der Maximallyse wurden mit einem Lysepuffer behandelt. Proben spezifischer Lyse enthielten Target- und Effektorzellen.

2.2.6.1 Effektorzellen

2.2.6.1.1 TC-Präparation in Experimenten zur Ermittlung der Zytotoxizität von TC gegenüber allogenen PBMC

Die TC wurden in einem ersten Schritt isoliert und gewaschen (400 g, 5 min, RT). Als nächstes wurden sie in die 96-Well-Rundboden-Platten gegeben und mit TC-Aktivator (1 µl/ml) aktiviert. Die Dauer der Inkubation im Brutschrank umfasste 24 h. Im Anschluss daran wurden die PBMC präpariert und der Europium Assay durchgeführt (s. u). Das Verhältnis von Targetzellen zu Effektorzellen wurde in diesem Versuchssetting auf 1:3; 1:6; 1:12; 1:25 und 1:50 festgelegt.

2.2.6.1.2 TC-Präparation in Experimenten zur Demonstration des Einflusses von *GraB cells*

Zur Demonstration des regulatorischen Einflusses von *GraB cells* auf TC war eine zusätzliche Präinkubation der Effektorzellen mit BC gleicher Spender notwendig. TC und BC wurden nach obigen Protokollen isoliert und gewaschen. Als nächstes wurden sie in den Verhältnissen 0:1; 1:0; 1:1; 1:2 und 1:4 in 96-Well-Rundboden-Platten gegeben. Zur Induktion der *GraB cells* gab man unmittelbar B21 hinzu. Nach 24 h der Koinkubation wurden die TC stimuliert, indem man den TC-Aktivator (1 µl/ml) hinzugab. *GraB cells* sollten zu diesem Zeitpunkt TC in ihrer Proliferation und zytotoxischen Funktion hemmen. Nach einem weiteren Tag der Koinkubation wurden die PBMC vorbereitet und der Assay durchgeführt Folgende Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen waren vorgesehen: 1:0; 0:1; 1:1; 2:1; 4:1.

2.2.6.2 Vorbereitung der Targetzellen (PBMC)

Für den Assay wurden spenderfremde PBMC verwendet. In Vorbereitung auf die Beladung mit BATDA wurden $10x10^6$ PBMC bei 400 g, RT, 5 min gewaschen. Nach Aufnahme in 10 ml Medium erfolgte die Zugabe von 10 µl BATDA. Gut durchmischt inkubierten die PBMC für 25 Minuten im Brutschrank. Es folgten drei Waschschritte mit dem vorgesehenen Waschpuffer bei 250 g, RT, für 7 Minuten: die ersten beiden mit je 20 ml, der dritte mit 10 ml des Puffers. Zum Schluss wurden die mit BATDA beladenen PBMC in einer Konzentration von $1x10^5$ PBMC/ml in Assay-Medium aufgenommen. 600 µl wurden für die Background Proben entnommen und abzentrifugiert.

2.2.6.3 Durchführung des Europium-Release-Assays

Effektor- und Zielzellen wurden in den o.g. Verhältnissen in 96-well-V-Boden-Platte überführt und für 2 h inkubiert. Das Volumen betrug je 100 µl. Dabei wurden Dubletten erstellt und Kontrollproben angefertigt. Der Spontanlyse-Ansatz beinhaltete 50 µl Targetzellsuspension und 50 µl Medium. Der Maximallyse-Ansatz bestand aus 50 µl Targetzellen, 20 µl Lysepuffer und 30 µl Medium. Als Background wurden 50 µl Assay-Medium und 50 µl Überstand abzentrifugierter Targetzellen verwendet. Nach 2 h Koinkubation wurden je 20 µl des Überstandes in eine 96-Well-Flachboden-Platte überführt und jeweils 200 µl vorgewärmte Europium-Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde für 15 Minuten unter Bedeckung mit Alufolie auf den Plattenschüttler gestellt. Die Europiumionen konnten in dieser Zeit mit TDA einen fluoreszierenden Komplex (Eu-TDA) ausbilden, unter der Voraussetzung, dass dieses durch lysierte Zellen freigesetzt worden war. Ausgewertet wurde der Versuch am *POLARStar Omega microplate reader* über die Ermittlung der *time resolved fluorescence.* Das gemessene Signal gibt Aufschluss über die Menge der lysierten Zellen. In die Auswertung gingen nur Versuche mit einer Spontanlyse ≤ 45% ein. Prozentual berechnet sich die spezifische Lyse folgendermaßen:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \left(\frac{(\text{Probe}-\text{Background})-(\text{Spontanlyse}-\text{Background})}{(\text{Maximallyse}-\text{Background})-(\text{Spontalyse}-\text{Background})}\right) * 100$$

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Microsoft Excel anhand Flow Jo-basierter Rohdaten. Im Vordergrund stand die Durchführung einer deskriptiven Statistik. Prozentuale Anteile und Mediane wurden hierzu in Box-Plots dargestellt mit dem Interquartilsabstand als Kastenbegrenzungen und Maximal- bzw. Minimalwerten als Whisker. Die horizontale Linie innerhalb des Boxplots entspricht dem Median. Alternativ wurden die Rohdaten gemittelt und in Balkendiagrammen dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den *Standard Error of the Mean* (SEM). Angefertigt wurden die Diagramm mit Graphpad Prism 8.4.3.. In ausgewählten Beispielen wurde neben der deskriptiven Statistik die statistische Signifikanz untersucht: Dazu wurde der verbundene Student´s t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0{,}05$ herangezogen. In Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Hypothese wurde ein- oder zweiseitig getestet.

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollen zur Entwicklung regulatorischer B-Zellen als immunmodulatorisches Zelltherapeutikum mit dem Schwerpunkt auf der Behandlung der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD) beitragen. Die Experimente gliederten sich dabei in zwei Kategorien: In durchflusszytometrischen Intrazellulär-Färbungen wurde zum einen die Induktion der *GraB cells* mit innovativen Stimulanzien untersucht. Grundlegend war die vorausgehende Überprüfung der bekannten Stimulation mit B21. Zusätzlich wurde immer auch eine phänotypische Charakterisierung der *GraB cells* angestrebt. Zum anderen umfasste die Arbeit Assays zur Demonstration der T-Zell-Suppression durch *GraB cells*. Hierzu wurde *in vitro* ein allogenes Immungeschehen konstruiert. Nachzuweisen war in diesem Modell die Zytotoxizität von TC gegenüber spenderfremden PBMC und der immunsupprimierende Einfluss der *GraB cells* auf diese TC. Verwendet wurden zu diesem Zweck der PanToxiLux-Assay und der Europium-Release-Assay.

3.1 Induktion regulatorischer *GraB cells*

3.1.1 Stimulation mit anti-BCR und IL-21

3.1.1.1 IL-21

Die Kombination aus anti-BCR und IL-21 (B21) beschreibt den Goldstandard zur Generierung von *GraB cells*. Dabei gilt IL-21 als unabdinglich für die Erzeugung von *GraB cells*. Dieser Sachverhalt sollte in einem ersten Schritt überprüft werden: In unstimuliertem Zustand bemaß sich der prozentuale Anteil GrB-exprimierender B-Zellen im Mittel auf 1 %. Der Testbereich der IL-21-Stimulation war auf 25 ng/ml bis 100 ng/ml festgelegt. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des GrB^+ Anteils mit zunehmender IL-21-Konzentration (Abbildung 11, 12A). Unter Zugabe von 100 ng/ml des Interleukins waren im Durchschnitt 7,91 % der B-Zellen GrB^+. Dieser Anstieg war signifikant ($p < 0{,}0005$) [143]. Ähnlich verhielt sich die *Median Fluorescence Intensity* (MFI) von GrB (Abbildung 12B). IL-21 erwies sich damit als potentes Agens zur Induktion von *GraB cells*. Seine Bedeutung wurde daran deutlich, dass die isolierte Stimulation von B-Zellen mit anti-BCR keine *GraB cell*-induktiven Kapazitäten aufwies (Abbildung 13, 15). Die Anwesenheit des Zytokins war demnach eine Grundvoraussetzung für die Induktion regulatorischer *GraB cells*.

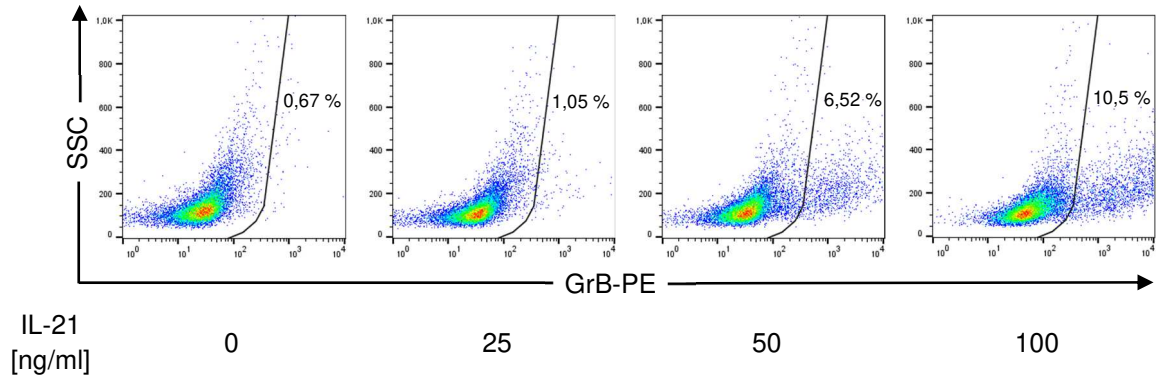


Abbildung 11 | Zunahme des Granzym B (GrB)-positiven Anteils in Abhängigkeit von Interleukin 21: In der Abbildung ist exemplarisch das Experiment V12 (s. Anhang) dargestellt. Ausgehend von einem Leukapheresat wurden B-Zellen isoliert und in den tabellarisch angegebenen Konzentrationen mit Interleukin 21 (IL-21) behandelt. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug 48 h. Anschließend erfolgten eine Intrazellulär-Färbung für GrB in Phycoerythrin (GrB-PE) und die Messung der Zellen mit dem Durchflusszytometer. Mit der Software Flow Jo wurde danach der Anteil GrB-positiver B-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die zugehörigen Pseudocolor Plots: Auf der Y-Achse ist der Side Scatter (SSC), auf der X-Achse GrB-PE aufgetragen. Das Gate (schwarz) schließt den Anteil GrB-exprimierender B-Zellen ein. Es wurde in allen vier Proben einheitlich verwendet. Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

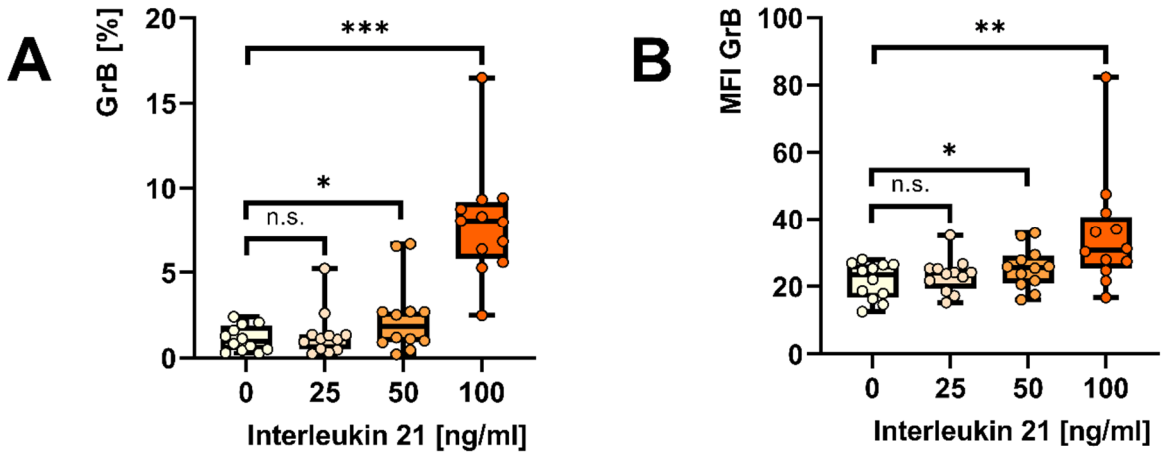
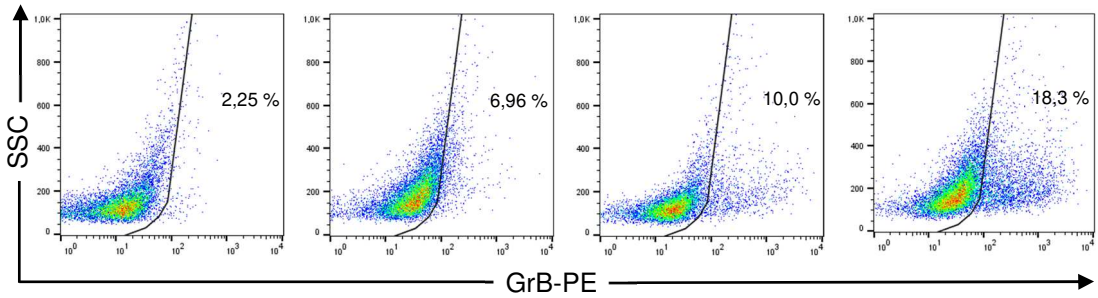


Abbildung 12 | B-Zell-Stimulation mit Interleukin 21: Die Isolation von B-Zellen (BC) erfolgte aus zwölf Leukapheresaten. Die BC wurden anschließend mit Interleukin 21 (IL-21) in aufsteigenden Konzentrationen behandelt. Eine unstimulierte Mediumprobe wurde ihnen als Negativkontrolle gegenübergestellt. Die BC inkubierten für 48 h im Brutschrank. Anschließend wurden die BC intrazellulär für Granzym B in Phycoerythrin (GrB-PE) gefärbt und durchflusszytometrisch erfasst. Unter **A** kommt der prozentuale Anteil Granzym B (GrB)-positiver Zellen zur Darstellung. Die median fluorescence intensity (MFI) von GrB ist in Box-Plot **B** abgebildet. **A + B:** Dargestellt sind Box-Plots aus n = 12 Versuchen (V6-12, V25, V26, V28, V29, V33, s. Anhang). Die statistische Analyse folgt dem gepaarten, zweiseitigen Student´s t-Test. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0{,}0005$ (***) bzw. $p < 0{,}005$ (**) oder $p < 0{,}05$ (*) angenommen. Nicht signifikante Zusammenhänge sind ebenfalls gekennzeichnet (n.s.). Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*



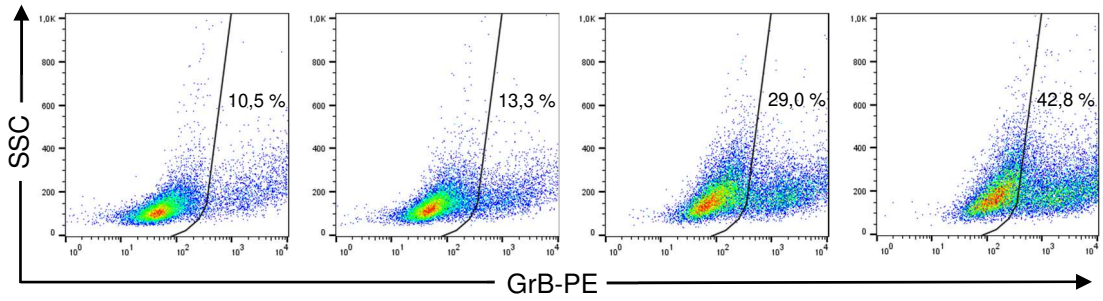
IL-21 [ng/ml]	-	-	100	100
anti-BCR [µg/ml]	-	12	-	12

Abbildung 13 | Isolierte B-Zell-Stimulation mit anti-BCR gegenüber Interleukin 21: Nach stattgehabter B-Zell-Isolation (Leukapheresat) erfolgte die Inkubation mit den angegebenen Stimuli für die Dauer von zwei Tagen. Im Anschluss daran wurde eine intrazelluläre Granzym B (GrB)-Färbung in Phycoerythrin (GrB-PE) samt durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Abgebildet sind Pseudocolor Plots aus dem Experiment V6 mit GrB-PE auf der X-Achse und dem Side Scatter (SSC) auf der Y-Achse. Von links nach rechts sind die Mediumprobe, die isolierte Stimulation mit gegen den B-Zell Rezeptor gerichteten Antikörpern (anti-BCR, 12 µg/ml), die isolierte Stimulation mit Interleukin 21 (100 ng/ml) und B21 (anti-BCR und IL-21) zu sehen. Das Gate umfasst GrB^+ Zellen.

3.1.1.2 B21

Die kombinierte Stimulation von BC mit IL-21 und anti-BCR (B21) stellt das Standardverfahren zur Generierung der *GraB cells* dar. In den nachfolgenden Experimenten wurde das Verhältnis von IL-21 zu anti-BCR detailliert untersucht.

Die Sekretion der Protease Granzym B konnte durch B21 gegenüber der Stimulation mit den Einzelkomponenten signifikant gesteigert werden (Abbildung 14, 15). Zur Ermittlung des Maximaleffekts wurden die Konzentrationen von anti-BCR (3 µg/ml, 6 µg/ml, 12 µg/ml, 25 µg/ml) und IL-21 (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) schrittweise gesteigert und miteinander kombiniert. Die Grundstimulation mit IL-21 erwies sich in diesem Versuchssetting ebenfalls bei 100 ng/ml als maximal wirksam. Fügte man zu dieser Basisstimulation anti-BCR der Konzentrationen 3, 6, 12, und 25 µg/ml hinzu, so zeichnete sich ein Plateau maximaler GrB-Expression mit den beiden höchsten anti-BCR-Zugaben, 12 bzw. 25 µg/ml, ab (s. Abbildung 15). Der Anteil an *GraB cells* konnte so im Durchschnitt 25-fach gegenüber der Negativkontrolle gesteigert werden [143].



IL-21 [ng/ml]	100	100	100	100
anti-BCR [µg/ml]	-	3	6	12

Abbildung 14 | B21-Stimulation unterschiedlicher Dosierung: Repräsentativ ist die Induktion Granzym B-exprimierender regulatorischer B-Zellen durch B21 in Experiment V12 dargestellt. B21 setzte sich aus Interleukin 21 (IL-21) und Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR) zusammen. Betrachtet wurde der Einfluss steigender anti-BCR-Dosierungen bei konstanter Basisstimulation mit 100 ng/ml Interleukin 21. Der dargestellte Ausschnitt umfasst die Stimulation mit 3, 6 und 12 µg/ml anti-BCR. Gegenübergestellt ist eine IL-21-Kontrollprobe (100 ng/ml). Mit Ablauf der Inkubationszeit (2 d) wurde eine intrazelluläre GrB-Färbung der isolierten B-Zellen (Leukapheresat) durchgeführt und die Fluoreszenzsignale mit dem FACSScan erfasst. Die abgebildeten Pseudocolor Plots zeigen die prozentuale Verteilung der B-Zell-Population. Auf der Y-Achse ist der Side Scatter, auf der X-Achse der Anteil GrB^+ B-Zellen in Phycoerythrin (GrB-PE) abgebildet.

Unter Einbezug des Medians und der Zellviabilität zeigte sich eine Überlegenheit der Stimulation mit 12 µg/ml anti-BCR gegenüber 25 µg/ml (Abbildung 15). Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf B21 durch 100 ng/ml Interleukin 21 plus 12 µg/ml anti-BCR definiert. Diese Stimulation wurde im weiteren Verlauf als Positivkontrolle zur GrB-Induktion betrachtet und stets mitgeführt. Zusammengefasst bestätigte sich, dass IL-21 für die Induktion von *GraB cells* erforderlich ist. 100 ng/ml des Zytokins erwiesen sich hierbei als optimale Konzentration. Die maximale Stimulation wurde unter Kombination mit 12 µg/ml anti-BCR erreicht.

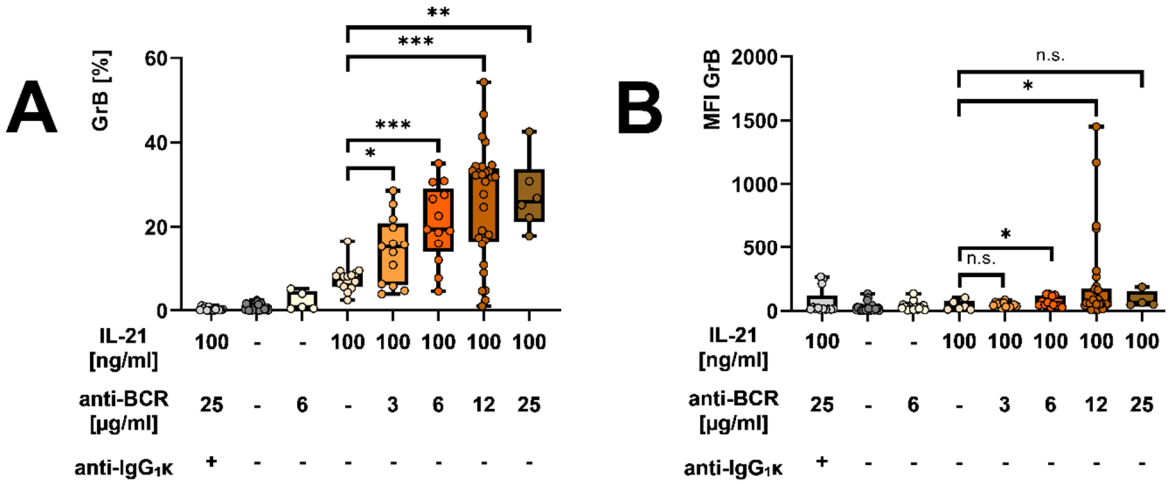


Abbildung 15 | **Granzym B-Parameter unter B21-Stimulation:** B-Zellen wurden aus peripherem Vollblut oder Leukapheresaten isoliert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit B21, die sich aus anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor) und Interleukin 21 zusammensetzte. Die Dauer der Kultivierung betrug 2 d. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch im Anschluss an eine intrazelluläre Granzym B-Färbung. Vergleichend wurden eine Negativkontrolle (Medium), eine Interleukin 21-Kontrolle, eine anti-BCR-Kontrolle und eine Isotypkontrolle (anti-IgG$_1$κ) mitgeführt. **A + B:** Übersichtsdarstellung mit anti-BCR-Stimulationen bis 25 µg/ml. Dargestellt sind Box-Plots aus n ≥ 4 Versuchen. B-Zellen wurden in 18 Versuchen aus Leukapheresaten isoliert (V6-12, V25, V26, V28, V29, V31, V33, V38, V43, V53, V58, V59; s. Anhang) und in zwölf Versuchen aus Vollblut (V39, V44, V45, V50, V51, V57, V60, V62, V63, V68, V69, V71; s. Anhang) isoliert. Unter **A** ist der Granzym B-positive Anteil, unter **B** die zugehörige *median fluorescence intensity* (MFI) aufgetragen. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0{,}0005$ (***) bzw. $p < 0{,}005$ (**) oder $p < 0{,}05$ (*) angenommen. Der zugrundeliegende statistische Test war der zweiseitige Student´s t-Test. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet. Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

3.1.2 Alternative Stimulanzien zur Induktion von *GraB cells*

Anti-BCR besteht aus polyklonalen F(ab´)$_2$-Fragmenten aus der Ziege. Diese bergen ein erhöhtes immunogenes Potential. Gerade im Hinblick auf die Entwicklung eines klinisch wirksamen Zelltherapeutikums zur Behandlung der GvHD sind solche xenogenen F(ab´)$_2$-Fragmente daher ungeeignet. Auf der Suche nach einer Alternative für die Stimulation des BCR wurden weitere Stimulanzien unter Standardbedingungen getestet. Zur Beurteilung ihrer Wirksamkeit wurden die Testproben mit Positivkontrollen (B21), Negativkontrollen (Medium), IL-21-Kontrollen (100 ng/ml) und Isotypkontrollen (IgG$_1$κ) derselben B-Zell-Spender verglichen. Gemessen und analysiert wurden die Prozentsätze GrB$^+$ BC und die mediane Fluoreszenzintensität von GrB. In einem zweiten Schritt wurde das untersuchte Stimulans mit Gamunex, Protein A/G oder anti-BCR kombiniert, um eine mögliche Potenzierung der Wirkung zu detektieren.

3.1.2.1 Protein A

Protein A ist als Antikörper-bindendes Protein eine Komponente bakterieller Zellwände einiger Staphylokokken-Stämme. Es besitzt fünf Bindungsstellen für die Fc-Regionen von Antikörpern. Da der B-Zell-Rezeptor Antikörpern strukturell sehr ähnlich ist, wurde eine Einflussnahme von Protein A auf die GrB-Produktion postuliert.

Tatsächlich steigerte Protein A die Sekretion von GrB: die Parameter GrB$^+$ Anteil und MFI für GrB waren unter Protein A-Zugabe signifikant erhöht (Abbildung 16, 17). Wie unter 3.1.1. gezeigt, war auch hier die Anwesenheit von IL-21 notwendig. Protein A wurde in den Konzentrationen 50 ng/ml, 500 ng/ml und 5000 ng/ml getestet. Bei der Konzentration 500 ng/ml entfaltete Protein A seine stärkste Wirkung. Im Mittel bewirkte es dabei einen Anstieg des GrB$^+$ Anteils um 4,32 Prozentpunkte gegenüber der IL-21-Kontrolle. Dennoch erzielte B21 mehr als doppelt so hohe Werte. Der durch Protein A bedingte Effekt blieb somit deutlich hinter der Positivkontrolle zurück. Die Addition von Gamunex erbrachte hinsichtlich der Zielgrößen eine minimale und nicht signifikante Zunahme. Die Kombination von Protein A, IL-21 und anti-BCR zeigte keinen signifikanten Vorteil gegenüber B21 (Abbildung 18). Zusammenfassend regulierte Protein A die Zielparameter positiv, erreichte jedoch nicht die Wirkung von B21.

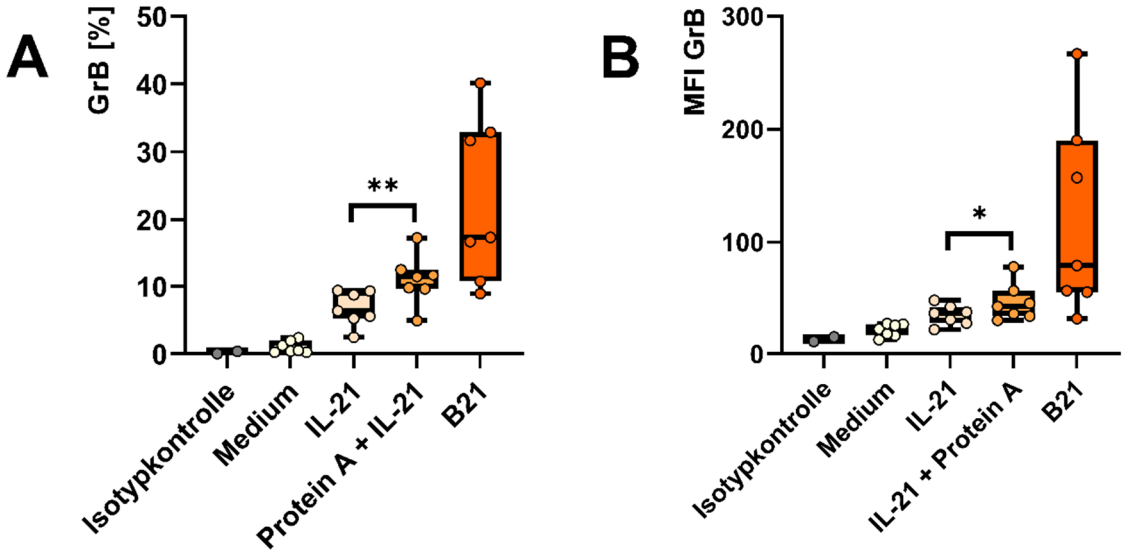


Abbildung 16 | Induktion von *GraB cells* via Protein A: Die Abbildung zeigt die Stimulation von B-Zellen mit Protein A in der Konzentration 500 ng/ml. Als Ausgangsmaterial für die B-Zell-Isolation dienten Leukapheresate (Versuch V6-12; s. Anhang). Kombiniert wurde Protein A mit 100 ng/ml Interleukin 21 (IL-21). Vergleichend wurden die Negativkontrolle (Medium), die IL-21-Kontrolle (100 ng/ml) und die B21-Positivkontrolle (anti-BCR plus IL-21) gegenübergestellt. Die Isotypkontrolle ($IgG_1κ$) enthielt Protein A in der Dosierung 5 µg/ml und IL-21 in der Konzentration 100 ng/ml. Die B-Zellen wurden auf diese Weise für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Es folgten eine Intrazellulär-Färbung und die Messung mittels Durchflusszytometrie. Panel **A** zeigt den prozentualen Granzym B-positiven Anteil (*GraB cells*) in Abhängigkeit der zugegebenen Stimulanzien. Panel **B** zeigt die dazugehörige *median fluorecence intensity* (MFI) für GrB. **A + B:** Dargestellt sind Box-Plots aus n = 7 Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem, zweiseitigen Student´s t-Test, wobei statistische Signifikanz bei $p < 0,005$ (**) bzw. $p < 0,05$ (*) angenommen wurde.

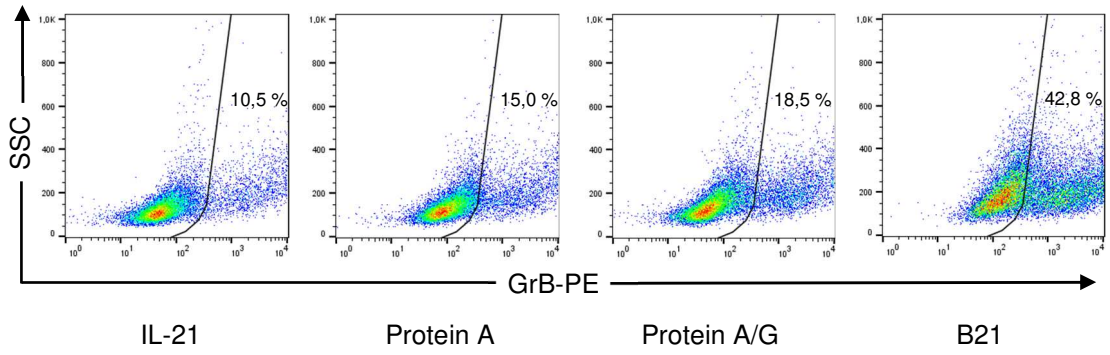


Abbildung 17 | Einflussnahme von Protein A und Protein A/G auf den Anteil an *GraB cells*: Anhand V12 ist exemplarisch die Induktion von Granzym B (GrB)-positiven regulatorischen B-Zellen (*GraB cells)* mittels Protein A und Protein A/G in der Konzentration 500 ng/ml dargestellt: B-Zellen eines Leukapheresats wurden isoliert und für zwei Tage mit den angegebenen Stimuli inkubiert. Der Stimulation mit Protein A und Protein A/G war Interleukin 21 (IL-21) in der Konzentration 100 ng/ml beigefügt. Im Anschluss an die Kultivierung fand eine intrazelluläre Färbung mit GrB in Phycoerythrin (GrB-PE) statt. Die durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse wurden mit Flow Jo ausgewertet. Auf der Y-Achse ist der Side Scatter, auf der X-Achse GrB-PE aufgetragen. Die Versuchsproben wurden der IL-21-Kontrolle und der B21-Kontrolle bestehend aus Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR) plus IL-21 vergleichend gegenübergestellt. Dargestellt sind die entsprechenden Pseudocolor Plots. Die Prozentsätze für GrB^+ B-Zellen sind den Dotplots zu entnehmen.

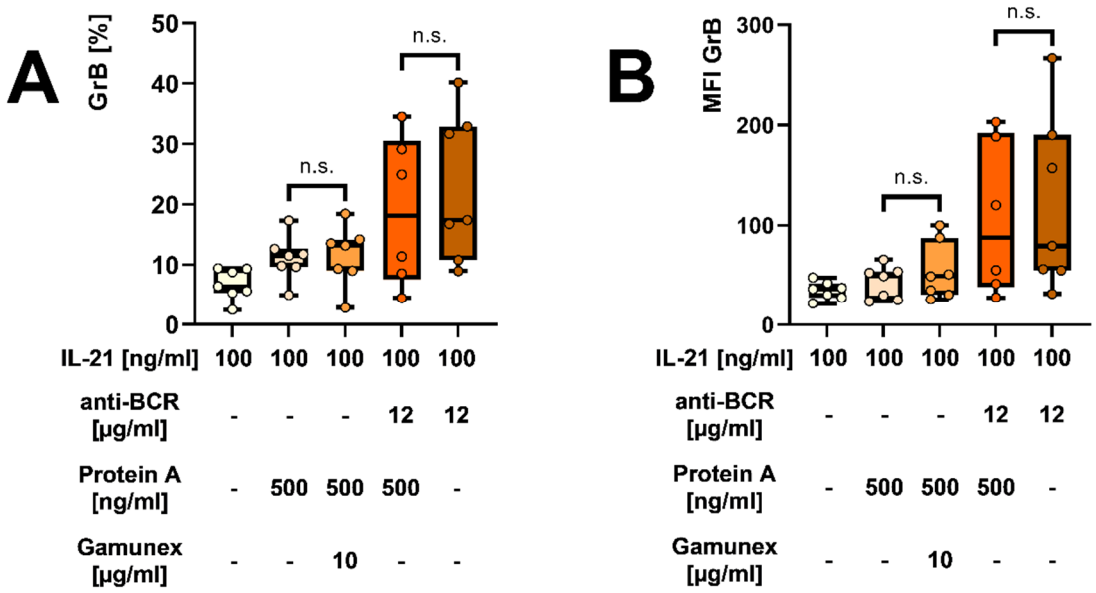


Abbildung 18 | Protein A-Stimulation mit additiver Zugabe von Gamunex oder anti-BCR: Die Abbildung präsentiert den kombinierten Einfluss von Protein A in der Konzentration 500 ng/ml mit Gamunex (10 µg/ml) oder anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor; 12 µg/ml). Als Ausgangsmaterial für die B-Zell-Isolation dienten Laukapheresate (Versuch V6-12; s. Anhang). Die Interleukin 21 (IL-21)-Kontrolle beinhaltete 100 ng/ml des Zytokins, die Positivkontrolle enthielt B21 (IL-21 plus anti-BCR), die Protein A-Kontrolle beinhaltete Protein A (500 ng/ml) und IL-21 (100 ng/ml). Die Inkubationszeit betrug zwei Tage. Die Auswertung erfolgt durchflusszytometrisch. Panel **A** zeigt den Einfluss von Gamunex (10 µg/ml) bzw. anti-BCR (12 µg/ml) auf den GrB^+ Anteil, Panel **B** die zugehörige *median fluorescence intensity* (MFI). **A + B:** Dargestellt sind Box-Plots aus n = 6 Versuchen. Die Statistische Analyse basiert auf einem zweiseitigen, verbundenen Student´s t-Test. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. abgekürzt.

3.1.2.2 Protein G

Im weiteren Verlauf wurde auch Protein G untersucht. Dieses wird aus der Zellwand von Streptokokkenstämmen gewonnen und besitzt zwei Bindungsstellen für die FC-Regionen von IgG. Vorgegangen wurde nach dem gleichen Prinzip wie unter Punkt 3 beschrieben. Protein G zeigte keinen merklichen Einfluss auf die Induktion von *GraB cells* (Abbildung 19): Weder der GrB^+ Anteil noch die MFI für GrB hoben sich signifikant von den entsprechenden Werten bei IL-21-Stimulation ab. Auch die Hinzugabe von Gamunex konnte keinen Effekt erzielen. Die Addition von anti-BCR ergab keinen relevanten Vorteil gegenüber B21 (Ergebnisse nicht gezeigt).

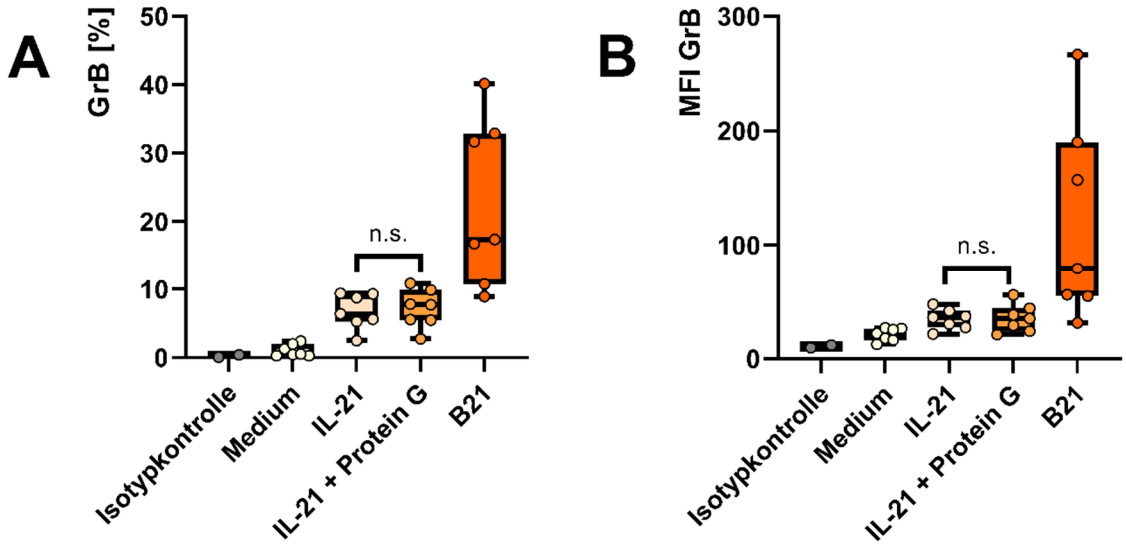


Abbildung 19 | **Stimulation mit Protein G:** B-Zellen wurden aus Leukapheresaten (Experiment V6-12; s. Anhang) unter Standardbedingungen isoliert und mit den genannten Stimulanzien für zwei Tage inkubiert. Protein G wurde in der Konzentration 500 ng/ml verwendet und mit Interleukin 21 (IL-21; 100 ng/ml) kombiniert. Die Isotypkontrolle enthielt Protein G (5 µg/ml) und IL-21 (100 ng/ml). Im Vorfeld der durchflusszytometrischen Messung fand eine intrazelluläre Granzym B (GrB)-Färbung statt. Panel **A** zeigt den GrB-positiven B-Zell-Anteil, Panel **B** die *median fluorescence intensity* (MFI) für Granzym B. **A + B:** Dargestellt sind Box-Plots aus n = 7 Versuchen. B21 bezeichnet die Stimulation mit IL-21 und gegen den B-Zell-Rezeptor gerichteten Antikörpern (anti-BCR). Die Statistische Analyse basiert auf einem zweiseitigen, verbundenen Student´s t-Test. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. abgekürzt.

3.1.2.3 Protein A/G

Protein A/G zeichnet sich durch die Fusion der Fc-Bindungsdomänen von Protein A und Protein G aus. Untersucht wurde Protein A/G in den Konzentrationen 50 ng/ml, 500 ng/ml sowie 5000 ng/ml. Protein A/G induzierte eine signifikante Steigerung der Expression von GrB in BC. V.a. der Anteil GrB^+ BC stieg nach Protein A/G-Stimulation stark an: Unter Zugabe von 500 ng/ml des Proteins konnte dieser im Mittel auf 13,91 % gegenüber 22,6 % der Positivkontrolle gesteigert werden. Damit erzielte Protein A/G einen stärkeren Effekt als Protein A und Protein G isoliert. Die Zugabe von Gamunex bewirkte eine zusätzliche Steigerung des Anteils GrB^+ BC (Abbildung 17, 20), welche mit 17,99 % im Durchschnitt knapp unter dem bei Stimulation mit B21 blieb. Insgesamt erwies sich Protein A/G damit als potenter Induktor von *GraB cells*. Die Positivkontrolle mit anti-BCR konnte es jedoch nicht übertreffen. Unter der Annahme, dass eine Kopplung Antikörper-bindender Proteine an Sepharose-Beads zu einer Kreuzvernetzung und einer stärkeren Aktivierung von B-Zellen hinsichtlich GrB-Produktion führen könnte, wurden weitere Versuche mit Protein A-Sepharose, Protein G-Sepharose und

Protein A/G-Sepharose durchgeführt. Getestet wurden Konzentrationen von 100 ng/ml bis 5000 ng/ml. Ein Vorteil durch die Sepharose-Kopplung konnte weder für Protein A/G-Sepharose noch für Protein A-Sepharose oder Protein G-Sepharose festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gegenteil: die unkonjugierten Proteine führten im Mittel zu höheren GrB-Werten als die Sepharose-gekoppelten Proteine.

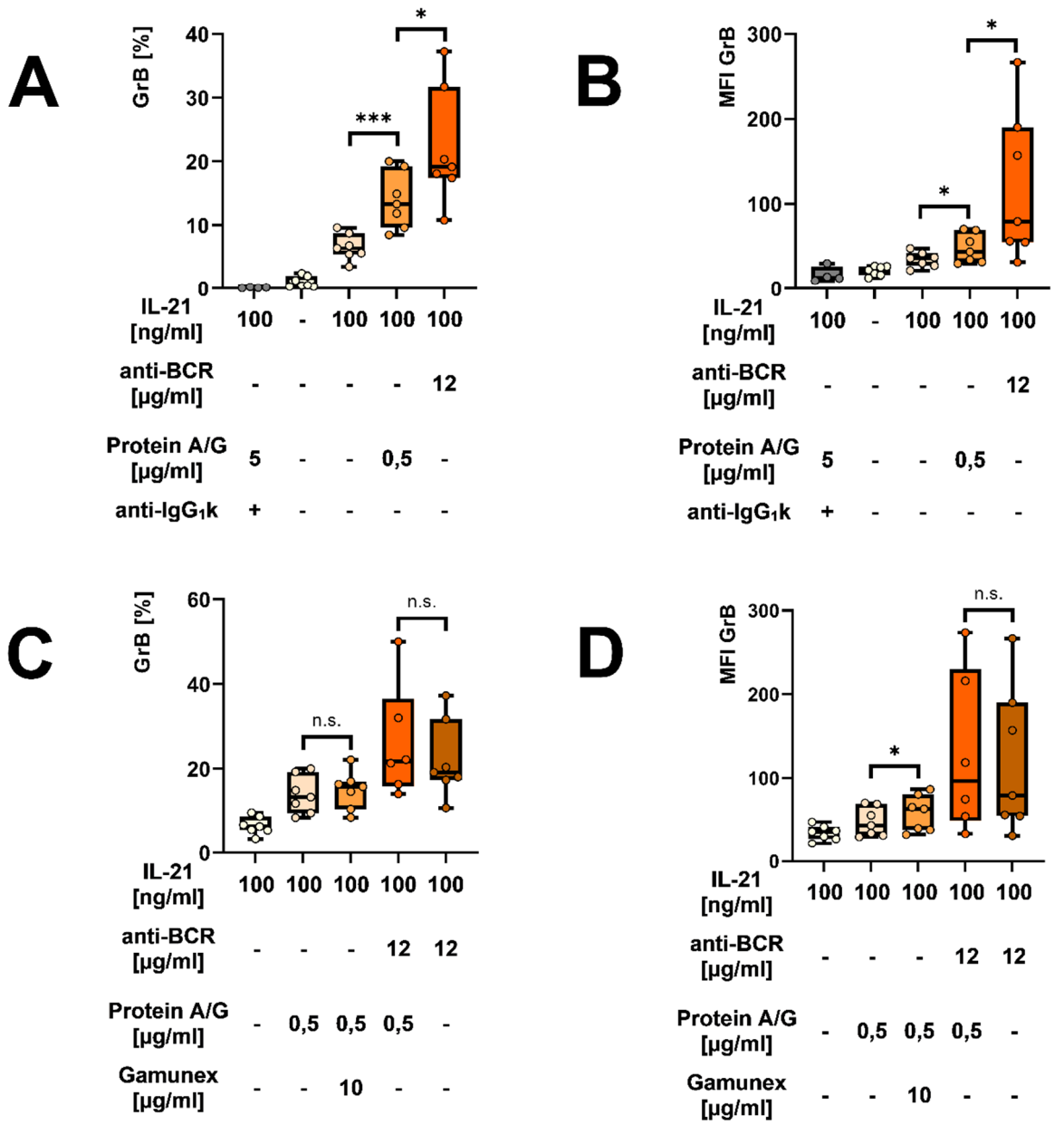


Abbildung 20 | Positive Modulation der Granzym B-Parameter durch Protein A/G: B-Zellen wurden aus Leukapheresaten von V6-12 (s.Anhang) isoliert und mit den angegebenen Stimulanzien behandelt. Durchflusszytometrisch wurden der Granzym B-positive Anteil (**A**) und die *median fluorescence intensity* (MFI) (**B**) erfasst, und der Negativ-, Positiv-, und Interleukin 21-Kontrolle gegenübergestellt. **C + D:** Gezeigt ist der additive Einfluss von Gamunex (10 µg/ml) oder anti-BCR (12 µg/ml) auf die Stimulation mit Protein A/G (500 ng/ml) und Interleukin 21 (100 ng/ml). Die Protein A/G-Kontrollprobe enthielt Protein A/G der Dosierung 5 µg/ml und Interleukin 21 (100 ng/ml). **A – D:** Abgebildet sind Box-Plots aus n = 7 Versuchen. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0{,}0005$ (***) bzw. $p < 0{,}05$ (*) angenommen. Der durchgeführte Signifikanztest war der Student´s t-Test (zweiseitig, verbunden). Nicht signifikante Veränderung sind mit n.s. gekennzeichnet.

3.1.2.4 Stimulation mit GRP-78, LPS, Ionomycin, MPLA und PHA

Im Folgenden wurden fünf weitere Substanzen getestet. Das *78 kDa glucose-regulated protein* (GRP-78) gehört der Familie der Hitzeschockproteine an. Dieser Substanzklasse werden BC-aktivierende Funktionen nachgesagt. Untersucht wurden die Konzentrationen 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml und 5,0 µg/ml. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte für GRP-78 kein Effekt nachgewiesen werden. Die untersuchten Zielgrößen wurden durch GRP-78 im Vergleich zur Basisstimulation mit IL-21 nicht verändert (s. Abbildung 21). Ebenso zeigten sich durch die Addition von Gamunex, Protein A/G oder anti-BCR keine Vorteile gegenüber den jeweiligen Kontrollprobe (Ergebnisse nicht gezeigt). Gleiches galt für die Untersuchung des Einflusses von Lipopolysacchariden. Eine Funktion an TLR mutmaßend, wurde es in den Konzentrationen 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml und 5 µg/ml getestet. Die Zielgrößen verblieben allerdings auf demselben Niveau wie mit den jeweiligen Negativkontrollen (Abbildung 21). Auch die Stimulation mit den Reagenzien Ionomycin (250-1000 ng/ml), Monophosphoryllipid A (0,1-20 µg/ml) und Phytohämagglutinin (0,5-20 µg) zeigten keine signifikante Induktion von GrB. GrB-MFI und Anteil GrB^+ BC hoben sich unter Zugabe dieser Substanzen nicht von den Werten unter Basisstimulation ab (Abbildung 22).

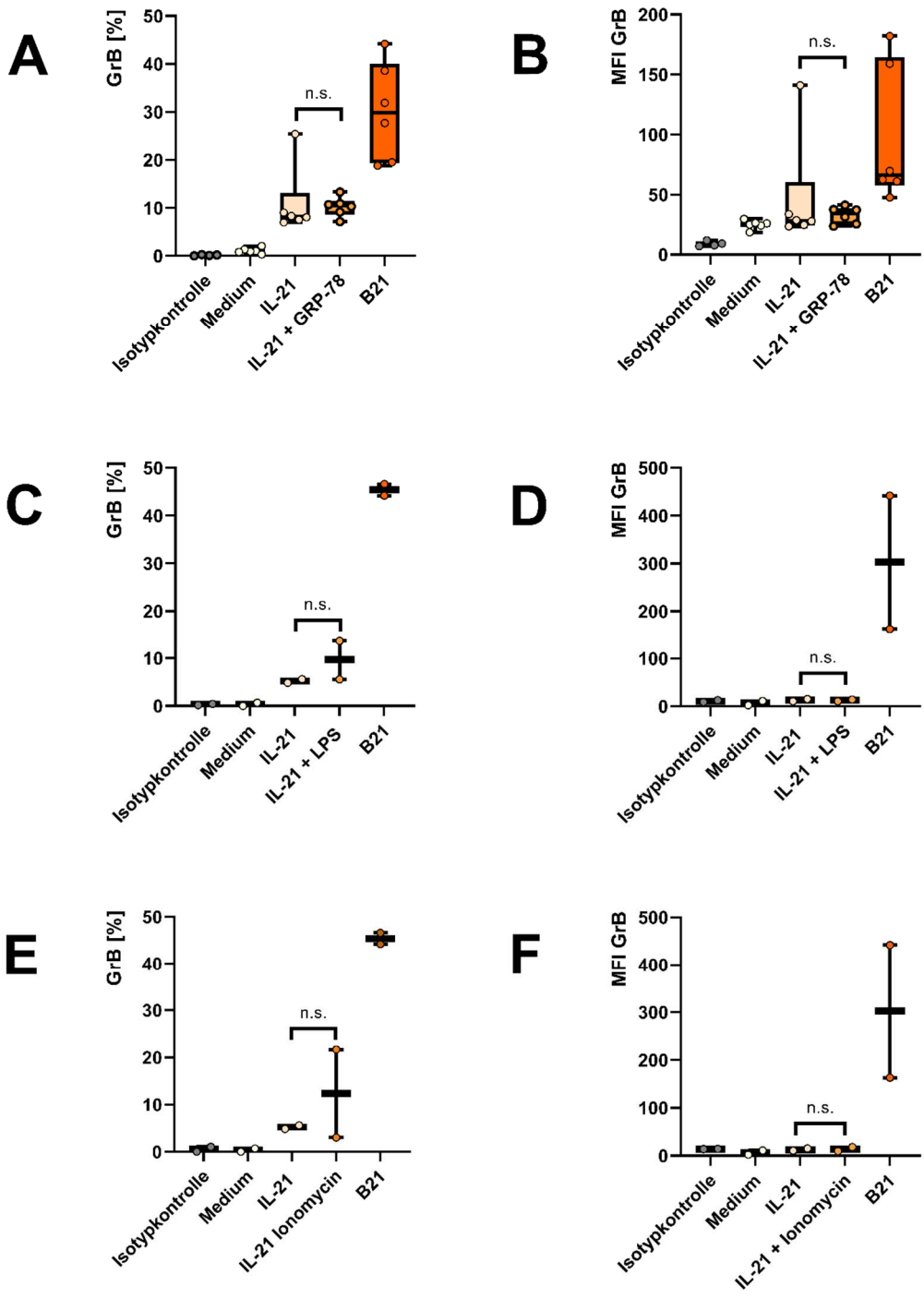


Abbildung 21 | B-Zell-Stimulation mit GRP-78, LPS und Ionomycin: B-Zellen (BC) wurden isoliert und für 48 h wie angegeben inkubiert. Die durchflusszytometrische Auswertung berücksichtigte den Granzym B (GrB)-positiven Anteil und die *median fluorescence intensity* (MFI) für GrB. Interleukin 21 (IL-21) wurde in der Dosierung 100 ng/ml verwendet. Verglichen wurden die Proben mit Negativ-, IL-21- und B21-Positivkontrolle (anti-BCR plus IL-21). Die Isotypkontrolle enthielt IL-21 und das untersuchte Stimulans. **A + B:** Dargestellt ist die Stimulation von BC aus Leukapheresaten (Versuch V25-29; s. Anhang) mit dem Hitzeschockprotein GRP-78 der Dosierung 2,5 µg/ml in n = 6 Versuchen mittels Box-Plots. **C** und **D** repräsentieren die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS; 2,5 µg/ml) in n = 2 Versuchen (Experiment V39, V40; s. Anhang). **E** und **F** zeigen die Stimulation mit Ionomycin (250 ng/ml) in n = 2 Versuchen (V39, V40; s. Anhang). **A – F:** Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*) angenommen. Der durchgeführte Signifikanztest war der Student´s t-Test (zweiseitig, verbunden). Nicht signifikante Veränderung sind mit n.s. gekennzeichnet.

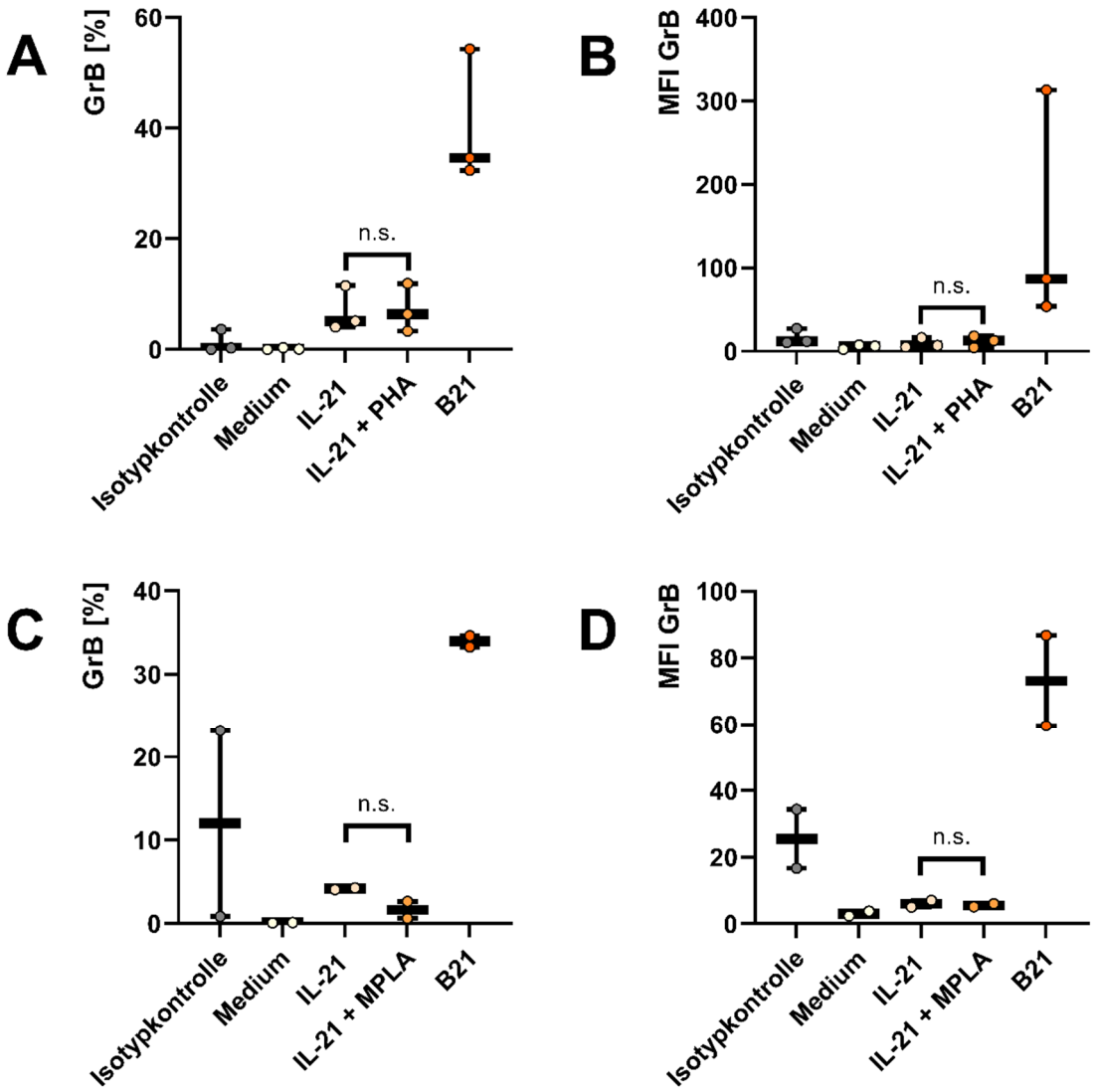


Abbildung 22 | Einfluss von MPLA und PHA auf die GrB-Induktion: Nach B-Zell (BC)-Isolation erfolgte die Stimulation mit den dargestellten Substanzen. Interleukin 21 (IL-21; 100 ng/ml) war Monophosphoryllipid A (MPLA) bzw. Phytohämagglutinin (PHA) stets beigefügt. Die Inkubationszeit betrug 2 d. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Verglichen wurden die Testproben mit den Kontrollproben. B21 beinhaltete anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor) plus IL-21). Die Isotypkontrolle enthielt IL-21 und das untersuchte Stimulans. Auf der Y-Achse sind die Zielparameter, der Prozentuale Anteil Granzym B (GrB)-exprimierender BC bzw. die *median fluorescence intensity* (MFI), abgebildet. Nicht signifikante Veränderung sind mit n.s. gekennzeichnet. **A + B:** Zu sehen ist der Einfluss der PHA-Stimulation auf den Anteil GrB^+ BC (A) und die GrB-MFI (B) mittels Box-Plots. BC wurden in zwei Experimenten aus peripherem Vollblut (V60, V63) isoliert, in einem Experiment aus einem Leukapheresat (V58)**.** In **C** und **D** sind die Auswirkungen von MPLA auf den Anteil GrB^+ BC (C) und die zugehörige GrB-MFI (D) in n = 2 Versuchen (V59, V62) in Box-Plots dargestellt. Als Ausgangsmaterial diente peripheres Vollblut.

3.1.3 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat als Induktor von *GraB cells*

Als weiterer potentieller Induktor von *GraB cells* wurde Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA) untersucht, für das als Aktivator der Proteinkinase C pleiotrope Effekte vorbeschrieben sind. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass PMA eine ähnliche Potenz wie anti-BCR aufweist, *GraB cells* zu induzieren (s. Abbildung 23, 25, 26) [143].

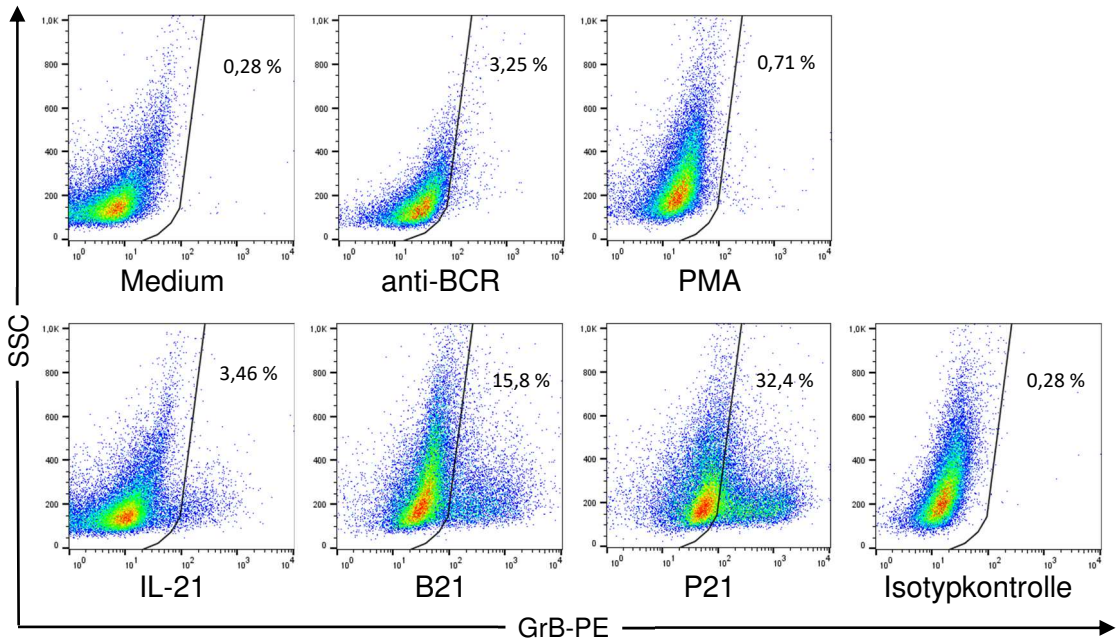


Abbildung 23 | Morphologische Darstellung des Einflusses von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat auf die Expression von Granzym B: Exemplarisch ist das Experiment V71 (s. Anhang) dargestellt. Auf den Pseudocolor Plots ist vertikal der Side Scatter (SSC) aufgetragen, horizontal die Granzym B-Signale im Phycoerythrin-Kanal (GrB-PE). Die Gates umschließen Granzym B-positive B-Zellen (GraB cells), die prozentualen Anteile sind jeweils angegeben. Zu sehen ist der Vergleich der P21-Probe (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat plus Interleukin 21) mit den Kontrollen. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml verwendet, Interleukin 21 (IL-21) in einer Konzentration von 100 ng/ml. Die Isotypkontrolle enthielt PMA und IL-21 in gleicher Dosierung. B21 bezeichnet die Stimulation mit IL-21 und anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor). Die B-Zell-Isolation in V71 erfolgte aus peripherem Vollblut. Die anti-BCR-Probe stammte aus dem Experiment V6 (Leukapheresat). Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

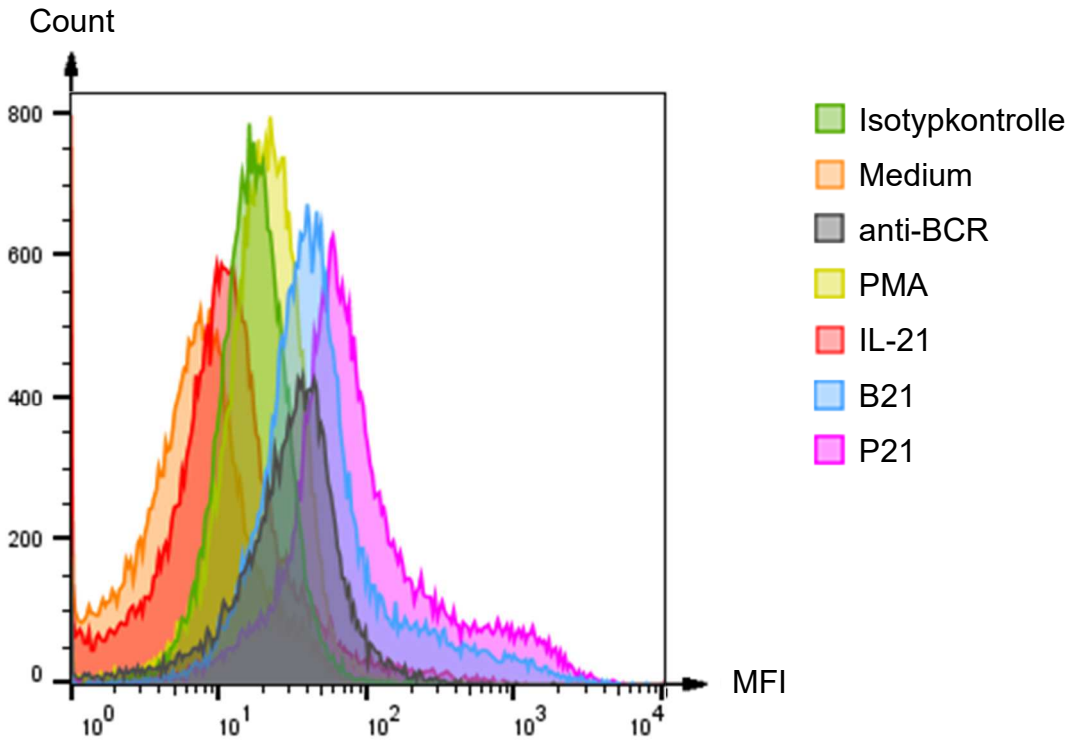


Abbildung 24 | Ausmaß der Induktion von Granzym B exprimierenden regulatorischen B-Zellen in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Stimulation: B-Zellen wurden isoliert und für die Dauer von 2 d mit den angegebenen Stimuli inkubiert. Im Anschluss an die intrazelluläre Färbung mit Granzym B (GrB) und die Messung wurden die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse übereinandergeschichtet. B21 bezeichnete die Stimulation mit Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR) und Interleukin 21 (IL-21), P21 hingegen die Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und IL-21. Die Isotypkontrolle enthielt PMA und IL-21. Mit Ausnahme der isolierten anti-BCR-Stimulation (Experiment V6, Leukapheresat; s. Anhang) stammten alle Proben aus Experiment V71 (s. Anhang) und wurden aus peripherem Vollblut isoliert. MFI bezeichnet die *median fluorescence intensity*.

3.1.3.1 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat und IL-21

Korrelierend mit den Ergebnissen aus Punkt 3.1.1. war IL-21 für die Differenzierung humaner *GraB cells* elementar: Ohne IL-21 erzielte Phorbol-12-myristat-13-Acetat keinen Effekt. 100 ng/ml des Zytokins erwiesen sich hierbei als optimal.

Die simultane Stimulation der BC mit PMA und IL-21 äußerte sich in einer ausgeprägten GrB-Expression [143]. Gegenstand anschließender Experimente war die Untersuchung des Maximaleffekts. Hierzu wurde PMA in aufsteigenden Konzentrationen (12 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml) mit IL-21 (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) kombiniert (Abbildung 26). Dabei zeichnete sich ein Optimum für PMA ab: Maximale Effekte erzielte PMA in der Dosierung 50 ng/ml, wenn es mit IL-21 der Konzentration 100 ng/ml kombiniert war [143]. Abweichungen von dieser Konstellation gingen mit einer Abnahme der gemessenen Parameter einher (Abbildung 26). Die geschilderte Zunahme des Anteils GrB^+ BC unter PMA-Zugabe erwies sich als signifikant. Im Vergleich zur IL-21-Kontrolle

induzierte P21 im Schnitt prozentual die 10-fache Menge an *GraB cells* (31,82 %). Damit übertraf PMA den induktiven Effekt von anti-BCR durchschnittlich um 8,28 Prozentpunkte (Abbildung 25) [143]. In einzelnen Versuchen betrug der Anteil an *GraB cells* bis zu 93,9 %. Dies implizierte nicht nur eine Gleichwertigkeit, sondern eine Überlegenheit der Stimulation mit P21 gegenüber B21. Die entsprechenden Werte der MFI für GrB verliefen analog zu den Prozentwerten, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den durch B21 induzierten Werten.

Da die Isotypkontrollen unter PMA-Stimulation auf einer Ebene mit der Negativkontrolle blieben, konnten unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden. Zusammengefasst induzierte die Stimulation mit P21 einen großen Anteil stark GrB-positiver (MFI) BC. Die erzielten Resultate ließen auf eine Gleichwertigkeit mit B21 schließen.

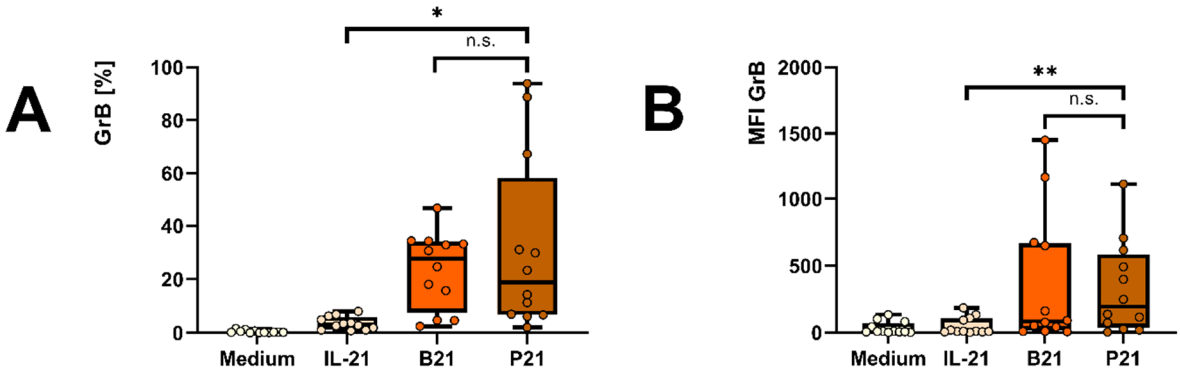


Abbildung 25 | **Gegenüberstellung der P21-Stimulation mit B21:** B-Zellen (BC) wurden aus peripherem Vollblut neun verschiedener Spender (V39, V44, V45, V50, V51, V57, V68, V69, V71; s. Anhang) bzw. Leukapheresaten vier verschiedener Spender (V38, V43, V53, V58; s. Anhang) isoliert und für 48 h stimuliert. Die P21-Probe definierte sich durch PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) in der Dosierung 50 ng/ml plus Interleukin 21 (IL-21) in der Konzentration 100 ng/ml. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Untersucht wurden der prozentuale Anteil Granzym B-exprimierender BC und die median fluorescence intensity (MFI). B21 bezeichnete die Stimulation mit IL-21 und Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR). **A + B:** Dargestellt sind Box-Plots aus n > 10 Versuchen. Als statistischer Test wurde der verbundene, zweiseitige Student´s t-Test gewählt. Statistisch Signifikanz wurde bei $p < 0{,}005$ (**) bzw. $p < 0{,}05$ (*) angenommen. Nicht signifikante Veränderung sind mit n.s. gekennzeichnet. Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

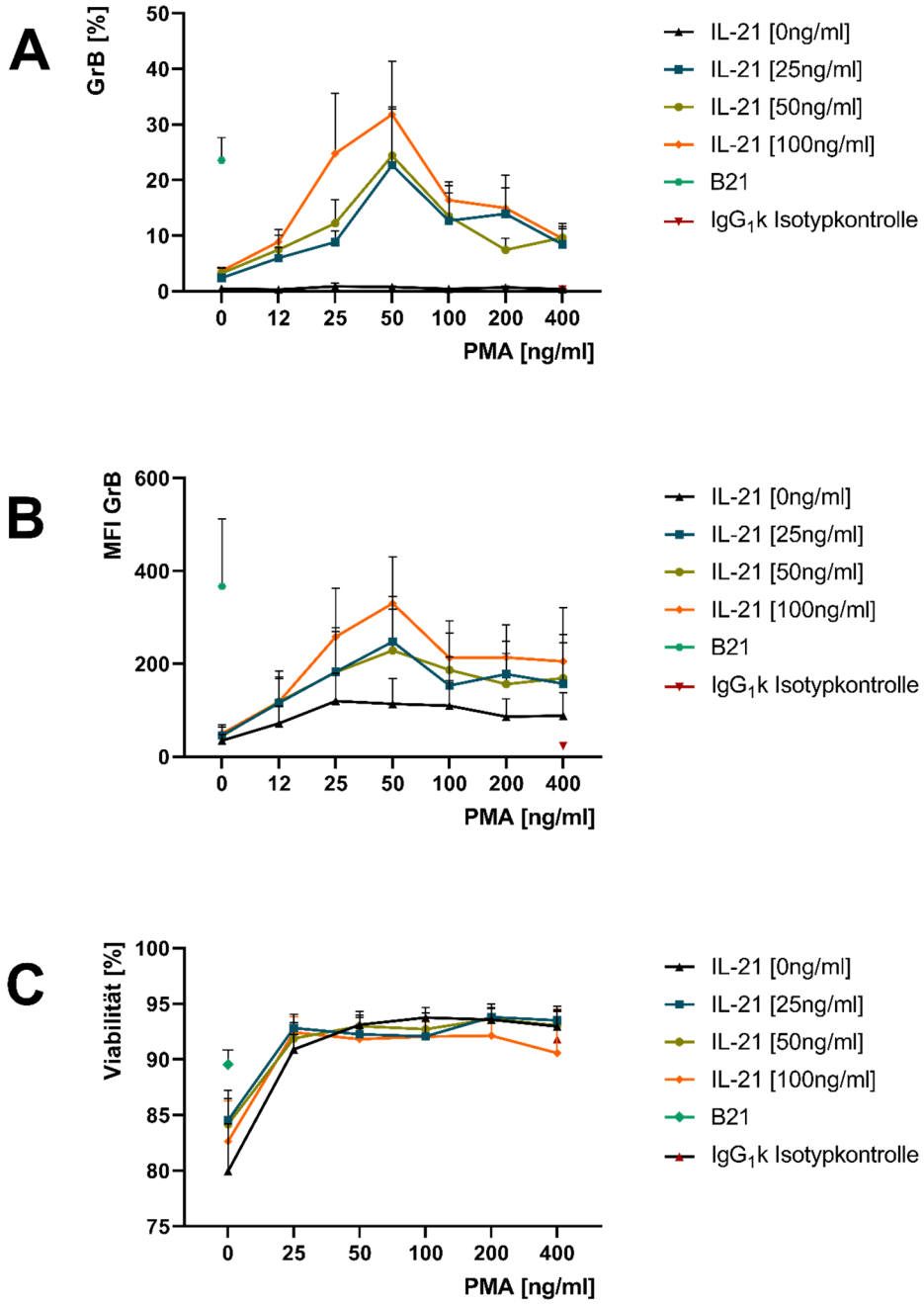


Abbildung 26 | Granzym B-Induktion in B-Zellen bei aufsteigenden Konzentrationen an Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Interleukin 21 (IL-21): B-Zellen (BC) wurden in neun Experimenten aus peripherem Vollblut (V39, V44, V45, V50, V51, V57, V68, V69, V71; s. Anhang) und in vier Versuchen aus Leukapheresaten (V38, V43, V53, V58; s. Anhang) isoliert und mit P21 (PMA plus IL-21) für 48 h stimuliert. Die Konzentration des verwendeten PMA ist der X-Achse zu entnehmen, die Konzentration von IL-21 ist der Legende am rechten Bildrand zu entnehmen. Im Anschluss an die intrazelluläre Färbung gegen Granzym B (GrB) erfolgte die Auswertung mit dem Durchflusszytometer. B21 bezeichnete die Stimulation mit IL-21 und Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR). **A + B:** Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen P21 und GrB. Panel **A** zeigt die prozentuale GrB-Expression in BC, Panel **B** die median fluorescence intensity (MFI) von GrB. Panel **C** zeigt die Viabilität der BC unter P21-Stimulation**. A – C:** Abgebildet sind Mittelwerte aus n > 10 Versuchen mit Fehlerbalken als standard error of the mean. Erstveröffentlichung in: *Veh et al.: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology, 14: 1194880(2023). CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.*

3.1.3.2 PMA in Kombination mit Protein A/G, Gamunex, anti-BCR und NBP

Gegenstand weiterer Untersuchungen waren die Kombination von PMA mit Protein A/G, Gamunex, NBP (NEMO binding peptide) oder anti-BCR. Dabei wurde Protein A/G in der Konzentration 1 µg/ml hinzugegeben, Gamunex in der Konzentration 10 µg/ml. Beide bewirkten minimale, nicht signifikante Veränderungen (Abbildung 27). NBP übte einen hemmenden Einfluss auf die Generierung von *GraB cells* aus. Der GrB-Anteil, die GrB-MFI und die Viabilität der Zellen sanken unter dem Einfluss dieses Peptids (Abbildung 28). Die Kombination von anti-BCR, PMA und IL-21 dagegen beeinflusste die Zielgrößen positiv. Der Anteil an GrB^+ BC überstieg sowohl die Kontrolle mit B21 als auch P21 signifikant. Gleiches galt für die GrB-MFI. Im Mittel induzierte die Dreifach-Stimulation GrB in 50 % der BC.

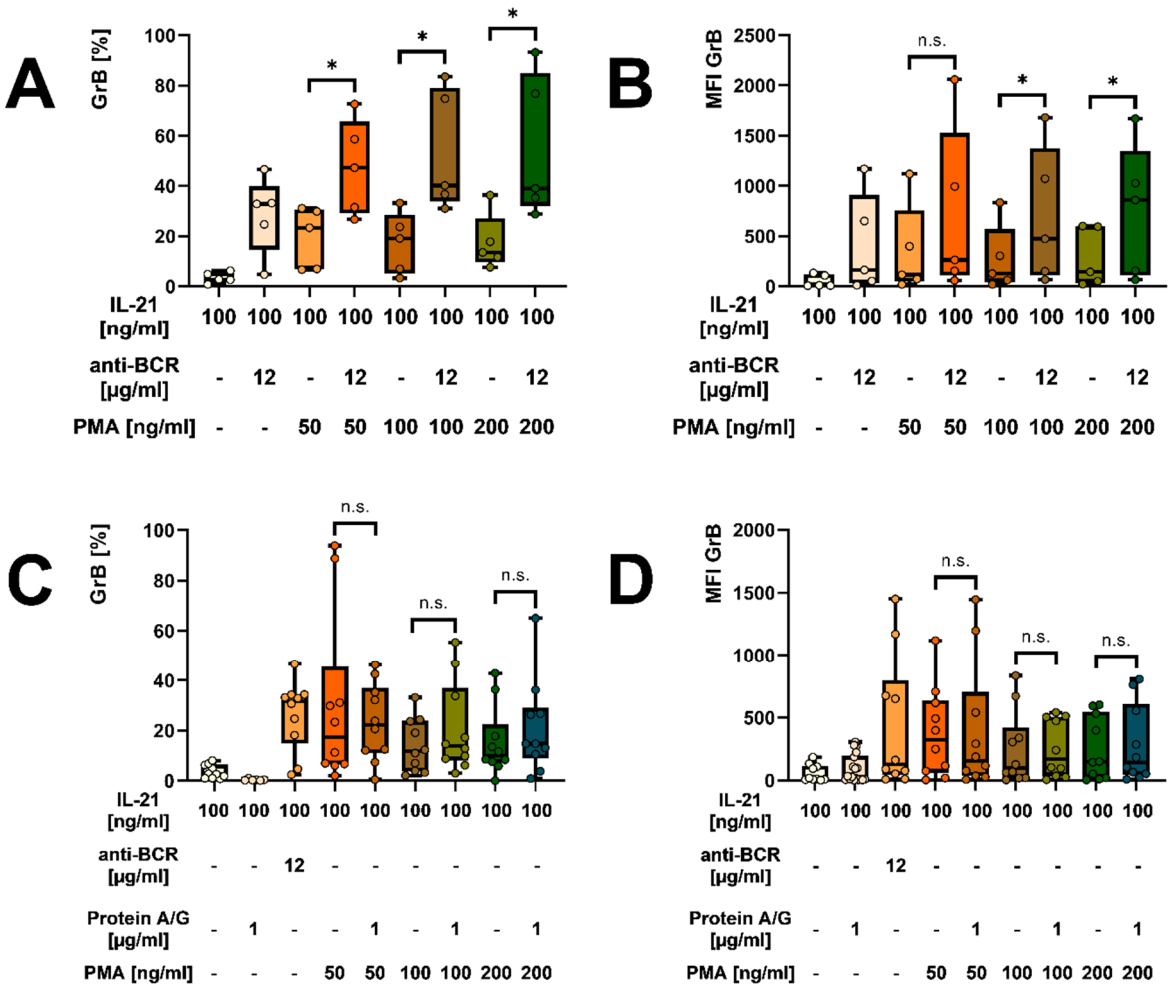


Abbildung 27 | Parallele Stimulation von B-Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und weiteren Stimulanzien: B-Zellen (BC) wurden isoliert, stimuliert, intrazellulär gegen Granzym B (GrB) gefärbt und durchflusszytometrisch erfasst. **A + B:** Gleichzeitige Stimulation mit P21 (PMA plus Interleukin 21) und anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor) in n = 5 Versuchen anhand von Box-Plots. BC-Isolation aus peripherem Vollblut (V39, V44, V45) und Leukapheresaten (V38, V43). **C + D:** Gleichzeitige Stimulation mit P21 und Protein A/G mit Box-Plots aus n = 10 Experimenten. BC wurden aus peripherem Vollblut (V39, V44, V45, V50, V51, V57, V69) und Leukapheresaten (V38, V43, V53) isoliert. **A – D:** Statistische Signifkanz (*) wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet.

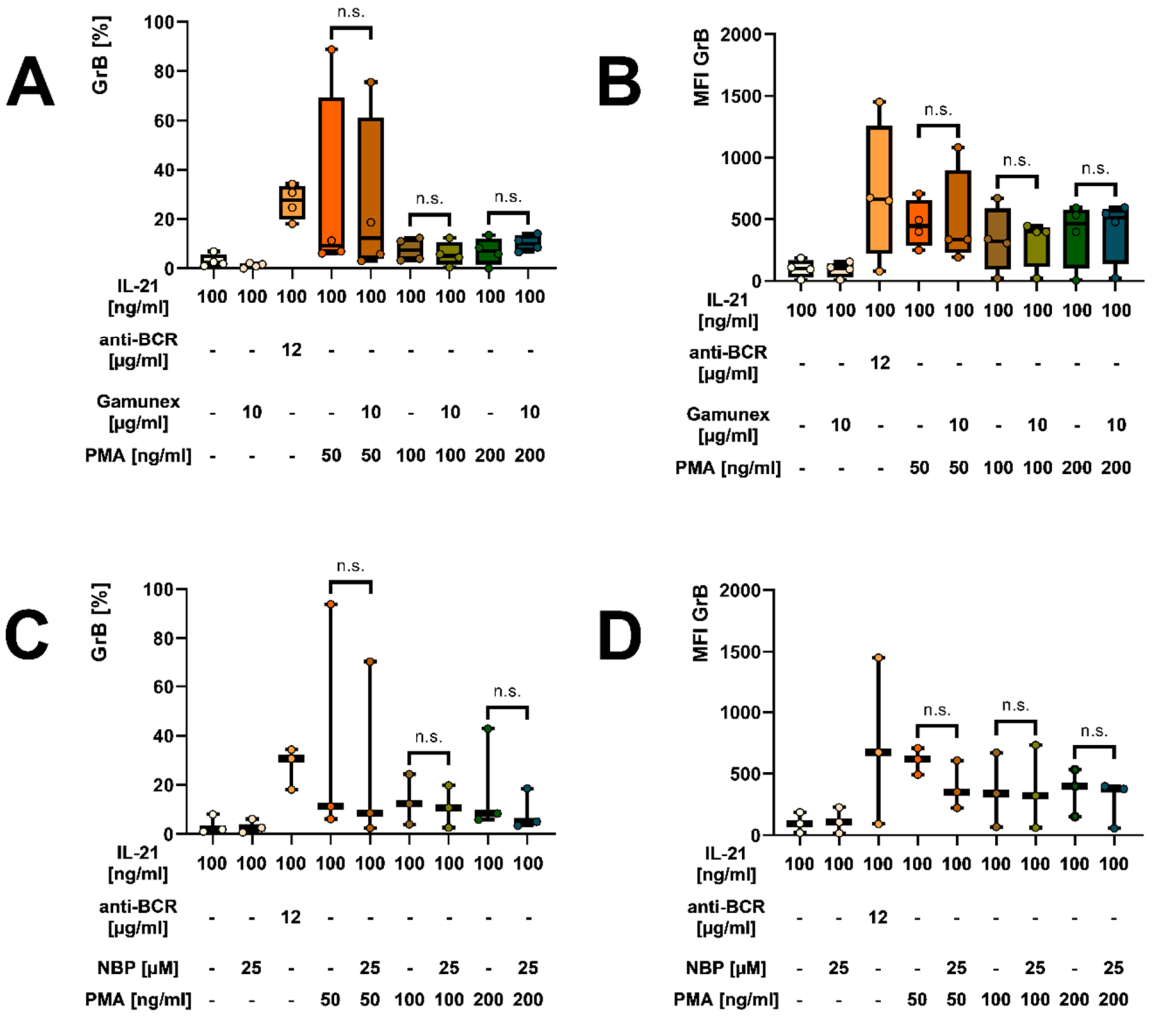


Abbildung 28 | Stimulation von B-Zellen mit P21 und Gamunex oder NEMO binding peptide (NBP): Im Vorfeld der durchflusszytometrischen Analyse wurden B-Zellen isoliert, stimuliert und intrazellulär gegen Granzym B (GrB) gefärbt. Als Positivkontrolle diente eine Probe mit Interleukin 21 (IL-21) und anti-BCR (Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor). **A + B:** Dargestellt ist die gleichzeitige Stimulation mit P21 (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat plus IL-21) und Gamunex mit Box-Plots aus n = 4 Versuchen (V45, V50, V51, V53). Statistische Signifkanz (*) wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet. **C + D:** Dargestellt ist die gleichzeitige Stimulation von B-Zellen aus peripherem Vollblut (V50, V51, V57) mit P21 und NBP mit Box-Plots aus n = 3 Versuchen. Statistische Signifkanz (*) wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet.

3.1.3.3 CD40 Ligand

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Einfluss von CD40-Ligand auf die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen beschrieben. Die Entwicklung von BC zu Plasmazellen geht einher mit einer Hemmung der Differenzierung zu GrB^+ BC. Dieser Effekt wurde nun im weiteren Verlauf auch im Kontext mit PMA überprüft. Dafür wurden die Proben mit PMA (50 ng/ml) und IL-21 (100 ng/ml) behandelt und gleichzeitig wurde auch CD40 auf BC über seinen Liganden stimuliert. Verwendet wurden hierfür Konzentrationen zwischen 25 und 200 ng/ml. Diese Experimente konnten eine negative Regulation der *GraB cell*-Differenzierung durch CD40-Ligand bestätigen, da unter Zugabe von CD40-Ligand niedrigere Anteile an GrB^+ BC gemessen wurden (Abbildung 29) [143]. Die maximale Hemmung war unter Zugabe von 25 ng/ml CD40-Ligand zu verzeichnen. Aufgrund der niedrigen Anzahl durchgeführter Versuche waren die Ergebnisse nicht signifikant, zeigten aber einen klaren Trend.

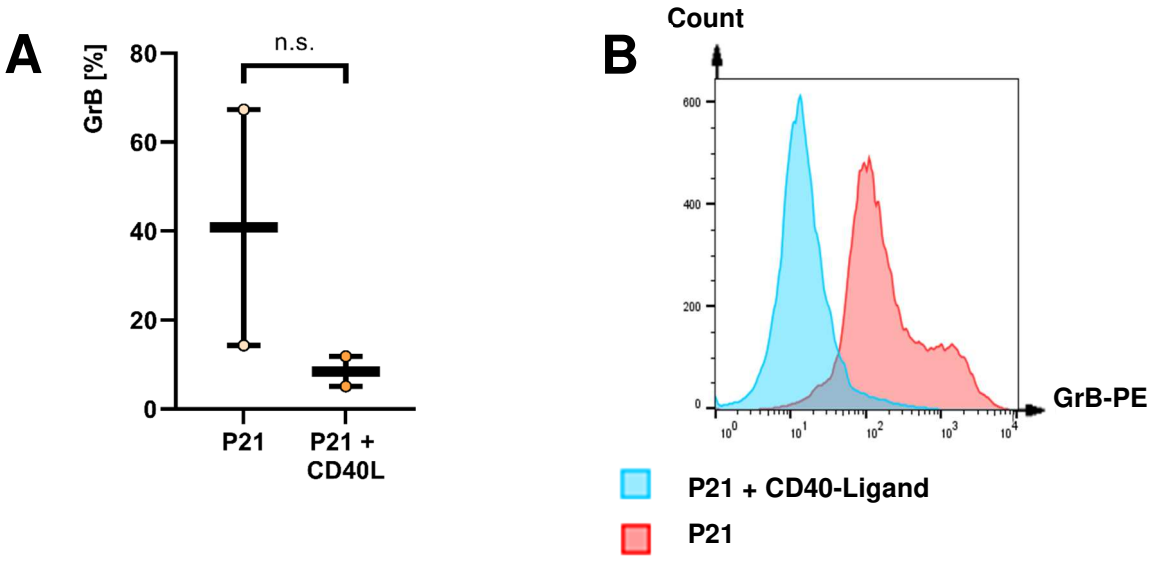


Abbildung 29 | Inhibierender Einfluss von CD40-Ligand auf die Induktion von *GraB cells* durch P21: Die zu vergleichenden Proben wurden mit P21 (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat plus Interleukin 21) stimuliert. Eine Probe enthielt zusätzlich CD40-Ligand (CD40L) in einer Konzentration von 25 ng/ml. Nach zweitägiger Inkubation erfolgte eine intrazelluläre Granzym B (GrB)-Färbung und die Auswertung mit dem Durchflusszytometer. B-Zellen (BC) wurden aus peripherem Vollblut isoliert. **A:** Dargestellt ist die Abnahme des Granzym B-positiven Anteils in Abhängigkeit von CD40-Ligand in n = 2 Versuchen (V68, V71; s. Anhang) anhand von Box-Plots. **B:** Exemplarische Gegenüberstellung eines Histogramms mit CD40L-behandelten BC (blau) gegenüber BC, die nicht mit CD40-Ligand behandelt wurden (rot). Zeitgleich wurden beide Proben mit P21 stimuliert.

3.1.3.4 Viabilität von BC in Abhängigkeit von PMA

Während das Seitwärtsstreulicht (SSC) als ein wichtiger morphologischer Parameter der Durchflusszytometrie Aufschluss über die Granularität von Zellen gibt, spiegelt das Vorwärtsstreulicht (FSC) die Zellgröße wider. Im Zusammenhang mit PMA stiegen beide Parameter, also Zellgröße und Zellgranularität, an. Um Einbußen der BC-Viabilität unter PMA-Zugabe auszuschließen, wurde diese im weiteren Verlauf anhand morphologischer Kriterien und mittels 7-Aminoactinomycin (7-AAD) untersucht. Stellte man das morphologische Viabilitätsgate der Negativkontrolle der P21-Probe gegenüber, so zeigte sich eine Zunahme des Anteils viabler Zellen (Abbildung 26, 31) [143]. Dieser Zusammenhang bestätigte sich im Mittel in n = 11 durchgeführten Experimenten und erwies sich als signifikant (s. Abbildung 30). Zu gleichem Ergebnis führte ein Experiment mit 7-AAD, welches als Marker nicht-viabler Zellen dient. Dabei nahm der Anteil 7-AAD positiver B-Zellen unter dem Einfluss von PMA nicht zu. Im Vergleich zur Negativkontrolle nahm der Anteil nicht-viabler Zellen sogar leicht ab. In Zusammenschau der geschilderten Ergebnisse hatte PMA keinen negativen Effekt auf die Viabilität der BC, weder morphologisch noch basierend auf 7-AAD-Färbung.

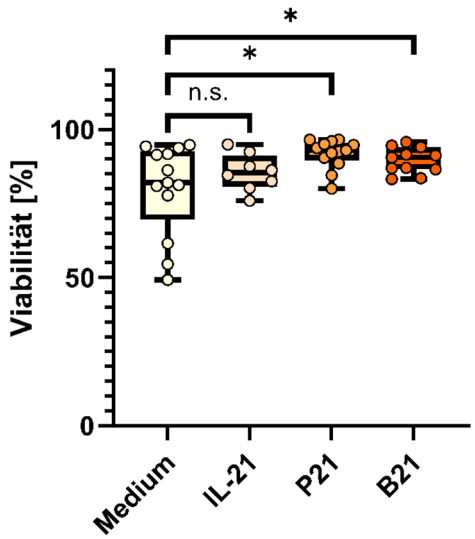
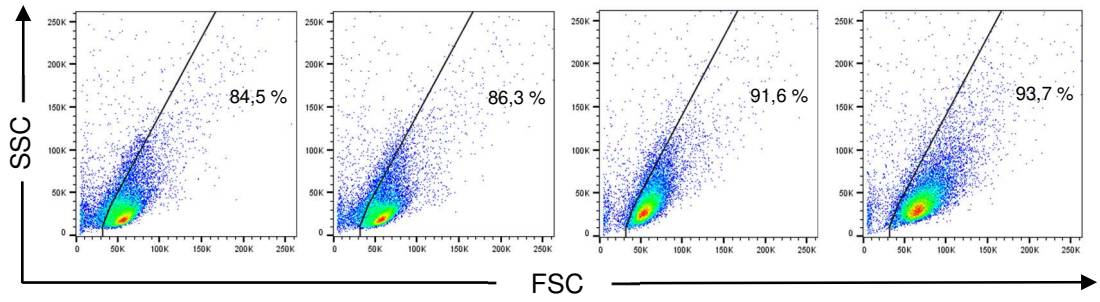


Abbildung 30 | Viabilität der B-Zellen anhand morphologischer Kriterien: Isolierte B-Zellen (BC) inkubierten für die Dauer von 2 Tagen mit den angegebenen Stimuli. Die Auswertung der Viabilität erfolgte im Anschluss daran auf Basis des morphologischen Viabilitätsgates. Dargestellt sind Box-Plots aus n = 11 Experimenten (V38, V40, V43, V44, V50, V51, V54, V57, V60, V69, V71; s. Anhang). Die Isolation erfolgte aus peripherem Vollblut und Leukapheresaten. B21 bezeichnete die Stimulation mit Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR) und Interleukin 21 (IL-21), P21 beinhaltete dagegen Phorbol-12-Myristat-13-Acetat und IL-21. Für die statistische Auswertung wurde der verbundene, zweiseitige Student´s t-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*) angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet.



IL-21 [ng/ml]	-	100	100	100
anti-BCR [µg/ml]	-	-	12	-
PMA [ng/ml]	-	-	-	50

Abbildung 31 | Morphologische Darstellung der Viabilität von B-Zellen in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Stimulation: B-Zellen (BC) wurden aus peripherem Vollblut isoliert und wie angegeben mit Interleukin 21 (IL-21), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat oder Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR) stimuliert. Die BC inkubierten darauffolgend für die Dauer von 2 Tagen im Brutschrank bei 37°C. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Dargestellt sind exemplarisch die Pseudocolor Plots aus V71. Aufgetragen ist der Side Scatter (SSC) gegen den Forward Scatter (FSC). Das morphologische Viabilitätsgate wurde einheitlich unter Einbezug der Kontrollen gesetzt. Es schließt den prozentualen Anteil viabler BC ein.

Aus den dargestellten Experimenten zur Induktion von *GraB cells* ließen sich sechs wesentliche Erkenntnisse ziehen [143]:

1. Die Induktion von *GraB cells* geschieht nur auf Basis der Stimulation mit IL-21.
2. Protein A und Protein A/G sind mäßige Co-Induktoren von *GraB cells*.
3. PMA ist ein potenter Co-Induktor von *GraB cells*.
4. PMA in der Dosierung 50 ng/ml und IL-21 in der Dosierung 100 ng/ml bewirken eine optimale Induktion von *GraB cells*.
5. Das durch PMA und IL-21 induzierbare Optimum ist mit B21 gleichwertig.
6. Die Viabilität der BC wird durch PMA nicht negativ beeinflusst.

3.1.4 Expression von Oberflächenmarkern auf *GraB cells*

Im Fokus weiterer Experimente stand die Phänotypisierung von *GraB cells*. Methodisch wurden hierfür parallel zu den intrazellulären GrB-Färbungen Oberflächenfärbungen verschiedener Marker durchgeführt. Untersucht wurde die Veränderung der Oberflächenausstattung der B-Zellen unter dem Einfluss der einzelnen *GraB cell*-Induktoren, also IL-21, anti-BCR, Protein A/G und PMA. Letzteren war IL-21 in der Dosierung 100 ng/ml stets beigefügt. Die Analyse erfolgte über die Ermittlung der *Median Fluorescence Intensity*.

CD20 wird bekanntermaßen von B-Zellen im Laufe der Hämatopoese exprimiert. Frühe Pro-B-Zellen und Plasmazellen sind hiervon ausgenommen. Die isolierte Stimulation mit IL-21 bewirkte eine Zunahme der MFI von CD20. B21, Protein A/G und PMA führten dagegen zu einer Abnahme der CD20-Expression. Den stärksten signifikanten Effekt erzielte B21 gefolgt von PMA und Protein A/G (Abbildung 32). Im Schnitt konnte die CD20-MFI um bis zu 35 % gesenkt werden. Dies geschah parallel zur Induktion von *GraB cells*, so dass die Herabregulation von CD20 als charakteristisch für sie betrachtet werden kann.

Die Marker CD80 und CD86 werden auf aktivierten B-Zellen exprimiert und wirken kostimulatorisch (CD28) bzw. koinhibitorisch (CTLA) auf die Aktivierung von TC. Die beiden Oberflächenmarker wurden nach Stimulation mit B21 und Protein A/G + IL-21 vermehrt exprimiert (Abbildung 33). P21 bewirkte zudem eine positive Regulation des Oberflächenmarkers CD83 (Ergebnisse nicht gezeigt).

B21 und P21 steigerten ferner die Expression der Oberflächenmarker CD25, CD38, CD71, CD147 und CD274 positiv. CD147 und CD25 zeigten dabei eine besonders starke Reaktion auf die Stimulation mit P21 (s. Abbildung 32). CD71, CD1d, IgM, CD5 und MHC II wurden v. a. durch B21 hochreguliert (s. Abbildung 33, 34). Die MHC I-MFI wurde unter IL-21-Stimulation geringfügig gesteigert. Unter Stimulation mit P21 oder B21 verblieb die MFI für MHC I auf einem Niveau mit der Negativkontrolle. Zusammenfassend ergab sich aus den Experimenten folgender Phänotyp für *GraB cells*: $GrB^{++}CD19^{+}CD20^{low}$MHC I^{+}MHC $II^{+}CD5^{+}CD1d^{+}CD25^{++}$ $CD38^{+}CD71^{+}$ $CD86^{+}$ $CD147^{+}CD274^{+}$.

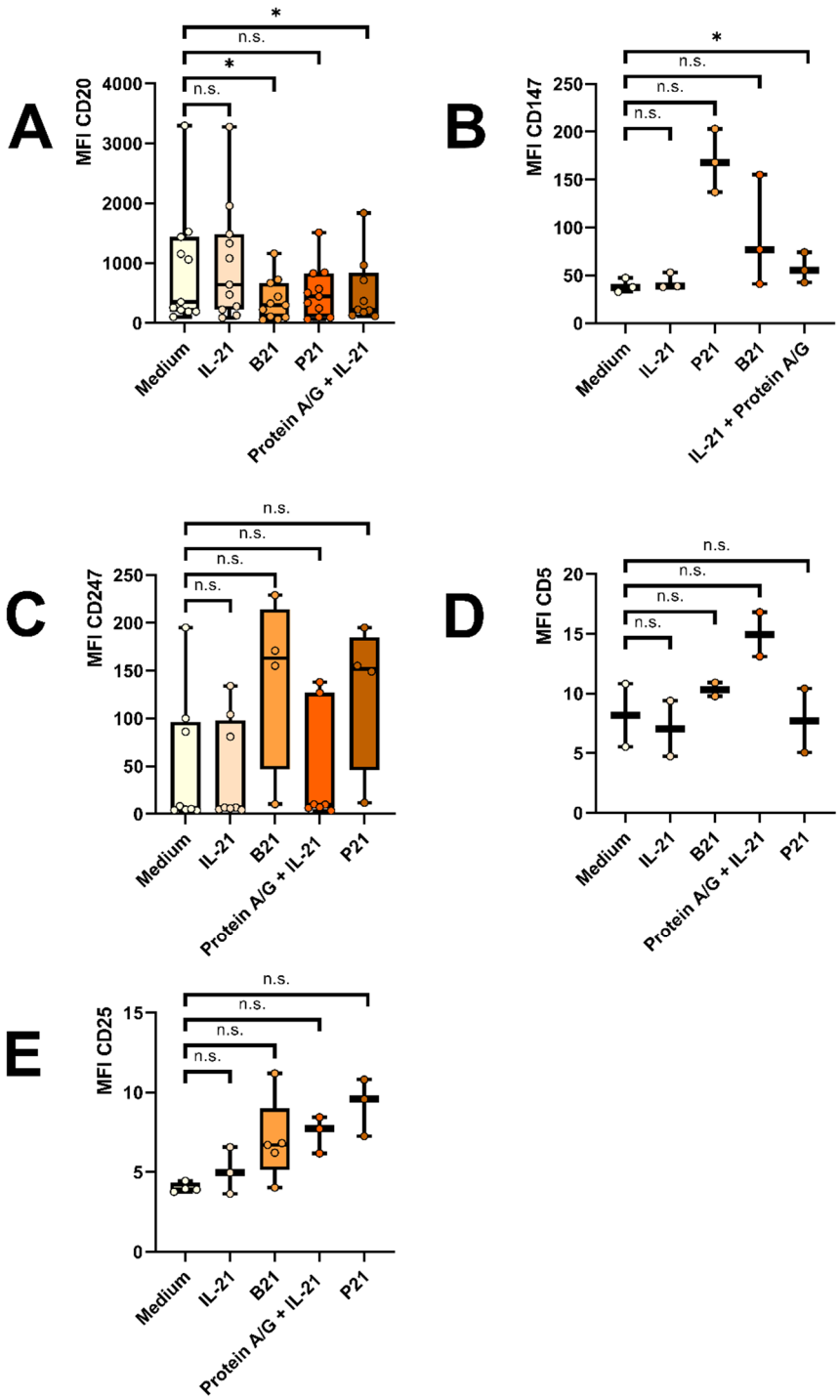


Abbildung 32 | Oberflächenmarker in Abhängigkeit von anti-BCR, Protein A/G und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA): B-Zellen (BC) wurden isoliert, für 2 d inkubiert, gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Negativ-, Interleukin 21 (IL-21)- und B21 (anti-BCR plus IL-21)-Kontrollen wurden standardmäßig pipettiert. Die P21-Probe enthielt 50 ng/ml PMA und 100 ng/ml IL-21. Die Protein A/G-Probe enthielt gleichfalls 100 ng/ml IL-21 und 5 µg/ml Protein A/G. Dargestellt ist jeweils die *median fluorescence intensity* (MFI) des Oberflächenmarkers. **A:** Boxplots aus n > 10 Versuchen (V40, V43-V45, V48, V50, V51, V54, V57, V68, V71; s. Anhang). **B:** Boxplots aus n = 3 Versuchen (V38-40, s. Anhang). **C:** Box-Plots aus n = 8 Versuchen (V13, V14, V17, V19, V43-V45, V50; s. Anhang). **D:** Boxplots aus n = 2 Versuchen (V54, V57, s. Anhang). **E:** Boxplots aus n = 6 Versuchen (V62-V64, V68, V69; s. Anhang). **A – E:** Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*) unter Verwendung des zweiseitigen, verbundenen Student´s t-Test angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet.

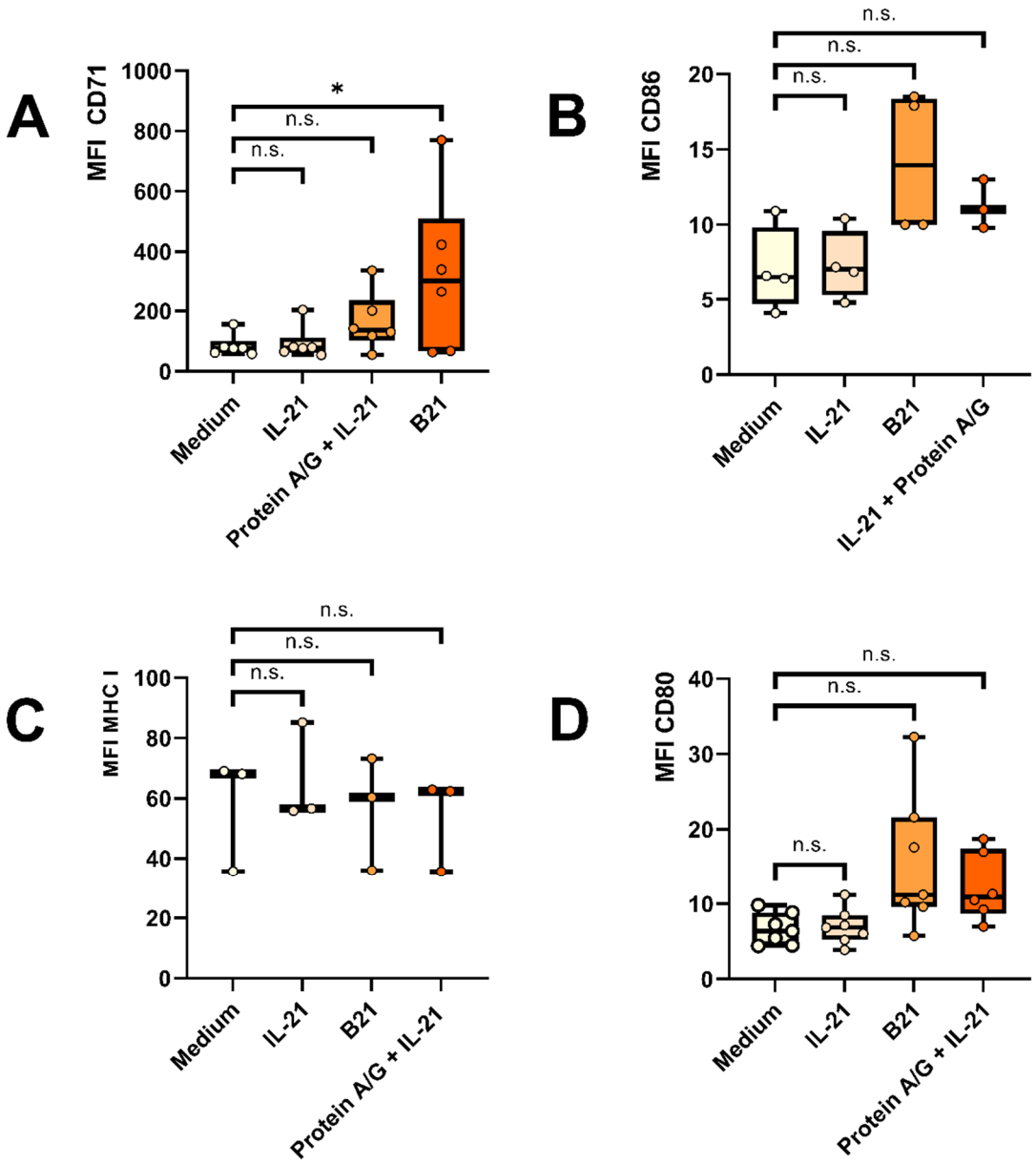


Abbildung 33 | Oberflächenmarker auf B-Zellen in Abhängigkeit von anti-BCR und Protein A/G: In den Box-Plots ist die *median fluorescence intensity* (MFI; Y-Achse) in Abhängigkeit von der Stimulation (X-Achse) aufgetragen. Protein A/G wurde in der Dosierung 5 µg/ml verwendet, Interleukin 21 (IL-21) in der Konzentration 100 ng/ml. B21 beinhaltete IL-21 und Antikörper gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR). **A – D:** Isolierte B-Zellen wurden gemäß den Angaben für 2 Tage stimuliert, dann gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Basierend auf dem Student´s t-Test wurde statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ (*) angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet. **A:** Die Box-Plots zeigen n = 6 Versuche (V10-V12, V16, V38, V39; s. Anhang). **B:** Boxplots aus n = 4 Versuchen (V6-V9). **C:** Box-Plots aus n = 3 Versuchen (V9, V10, V12; s. Anhang). **D:** Box-Plots aus n ≥ 6 Versuchen (V6-V8, V9, V11, V16, V48; s. Anhang)

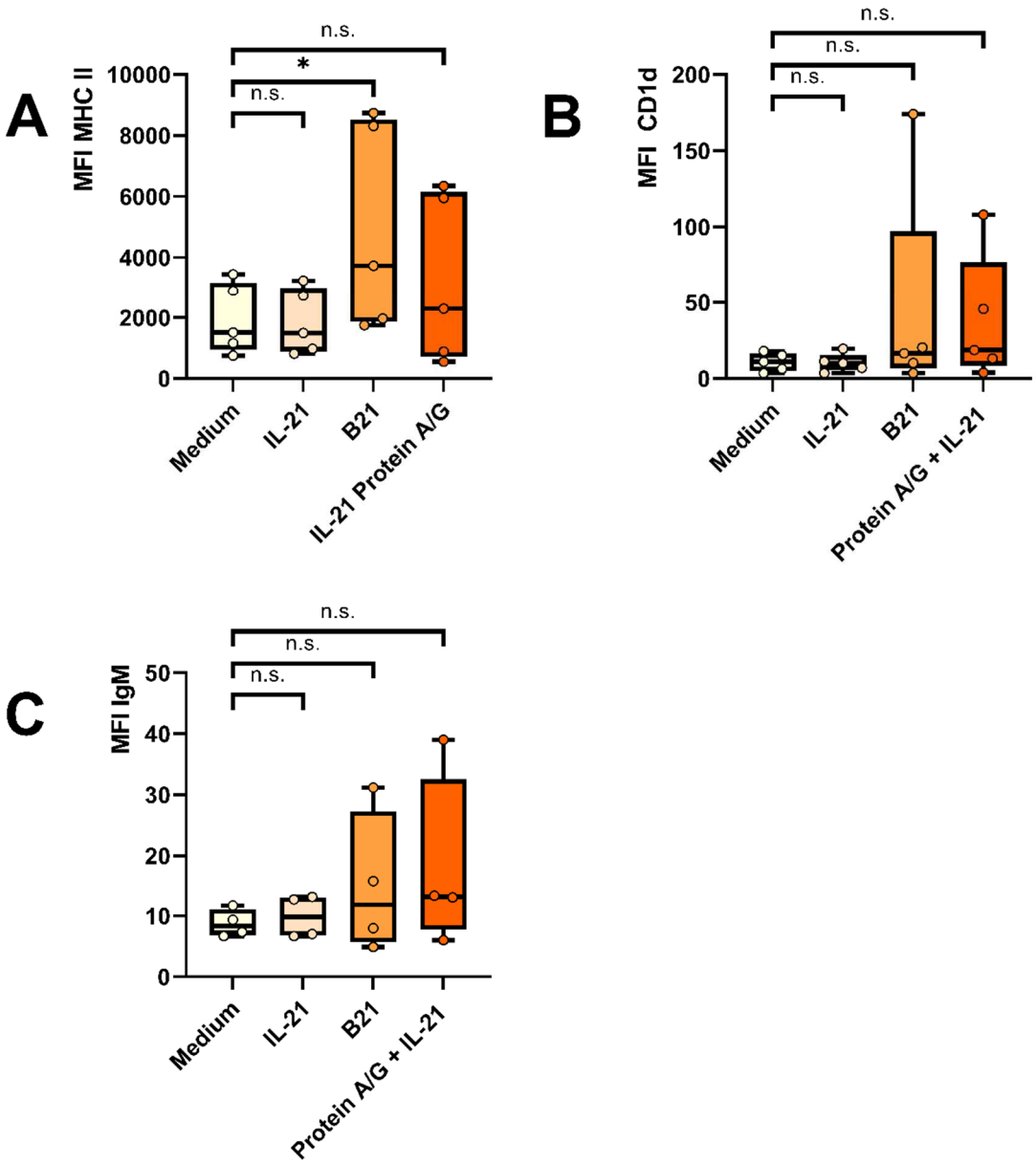


Abbildung 34 | Oberflächenmarkerexpression auf CD19⁺ B-Zellen innerhalb von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) in Abhängigkeit von anti-BCR und Protein A/G: PBMC wurden aus peripherem Vollblut (V13, V14, V17, V19; s. Anhang) isoliert für 48 h mit den angegebenen Stimulanzien inkubiert. B21 war aus Interleukin 21 (IL-21) und Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor (anti-BCR) zusammengesetzt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Mit Flow Jo wurde ein CD19⁺ Gate ermittelt, um die B-Zell-Fraktion zu erhalten. Innerhalb dieser Fraktion wurde die jeweilige *median fluorescence intensity* (MFI) betrachtet. Dargestellt sind Box-Plots aus n ≥ 3 Versuchen. Statistische Signifikanz wird bei $p < 0,05$ angenommen. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet.

3.2 *GraB cells* in einem allogenen *Mixed Lymphocyte Reaction*-Modell

3.2.1 Zytotoxizität von TC gegenüber allogenen PBMC

Wie unter Punkt 3.1.3.1 gezeigt, erwies sich PMA als potente Alternative zur Generierung von *GraB cells*. Im weiteren Verlauf sollten daher die regulatorischen Eigenschaften von *GraB cells* auch funktionell nachgewiesen werden. Zuallererst musste hierfür ein Modell etabliert werden, in welchem T-Zellen (Effektorzellen) im Sinne einer gewünschten Lymphozytenreaktion (MLR) gegenüber allogenen PBMC (Targetzellen) Zytotoxizität ausüben konnten. Methodisch wurden hierfür zwei Assays getestet, der Europium-Release-Assay und der PanToxiLux-Assay.

Unter Verwendung des Lineage-Mixes (2.2.5.2.) färbten sich im PanToxiLux-Assay mit steigender Effektorzahl zunehmend mehr Targetzellen mit dem Caspasesubstrat *PS* an (s. Abbildung 35, 36). Die spezifische Lyse konnte bei einer Spontanlyse von 32,9 % im Mittel auf bis zu 45,1 % gesteigert werden. Die zugehörige Maximallyse betrug 96,75 % (s. Abbildung 36). Eine spezifische Lyse allogener Targetzellen durch die applizierten Effektorzellen konnte daher nachgewiesen werden. Auch im Europium-Release-Assay konnte die zu erwartende Zytotoxizität der TC gegenüber allogenen PBMC nachgewiesen werden. Bei einer Spontanlyse von 19,48 % im Mittel und einer Maximallyse von 100 % betrug die spezifische Lyse in n = 3 Versuchen 39,59 % (Ergebnisse nicht dargestellt). Hieraus konnte auch in diesem Assay gefolgert werden, dass die Effektorzellen die Targetzellen spezifisch lysierten. Dies untermauerte die Ergebnisse des PanToxiLux-Assays und schuf die Rahmenbedingungen für den Einsatz der *GraB cells* in diesem *in-vitro* Modell.

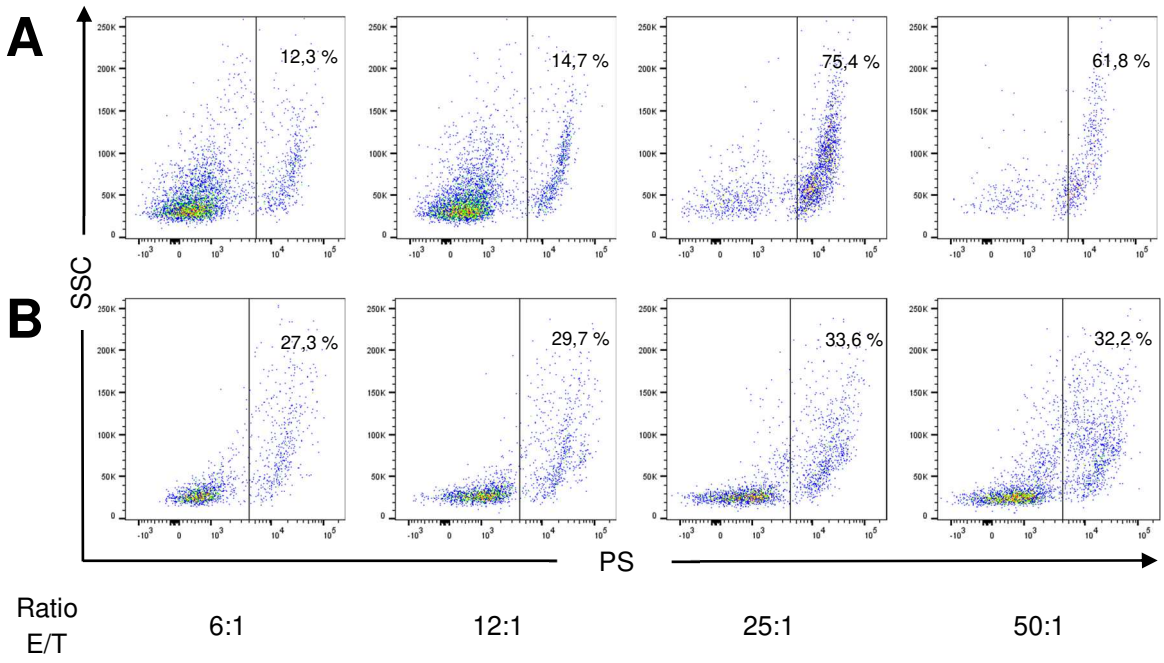


Abbildung 35 | Anteil apoptotischer Targetzellen in Abhängigkeit vom Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen: Exemplarisch sind V32 (A) und V36 (B) dargestellt. Die Effektorzellen (T-Zellen) wurden aus peripherem Vollblut isoliert und mit T-Zell-Aktivator für 48 h aktiviert. Nach zwei Tagen Inkubation erfolgte die Präparation der Targetzellen (Periphere mononukleäre Blutzellen, PBMC) aus peripherem Vollblut. Nach einer zweistündige Koinkubation mit den Effektorzellen wurde der PanToxiLux-Assay durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Die Abgrenzung von Target- und Effektorzellen erfolgte mithilfe eines Lineage-Cocktails bestehend aus CD14, CD19, CD20, CD1c und CD11c. Der prozentuale Anteil apoptotischer Targetzellen wurde im Anschluss anhand *PS*-positiver Zellen (X-Achse) ermittelt und ist der Grafik zu entnehmen. Auf def Y-Achse ist der Side Scatter (SSC) aufgetragen.

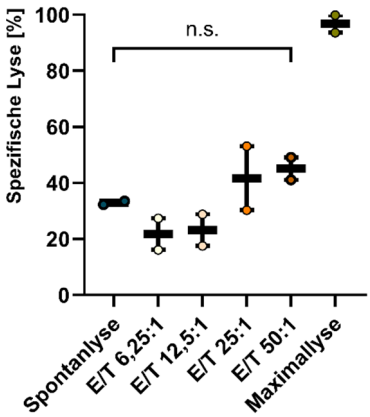


Abbildung 36 | Nachweis spezifischer Lyse im PanToxiLux-Assay: Dargestellt sind die Werte der spezifischen Lyse aus zwei unabhängigen Versuchen (V32 und V34; s. Anhang). Das Verhältnis von Effektor- zu Targetzellen ist der X-Achse zu entnehmen. Die T-Zellen (TC) wurden aus peripherem Vollblut bzw. Leukapheresat isoliert und mit TC-Aktivator für 48 h aktiviert. Nach zwei Tagen Inkubation erfolgte die Präparation der Targetzellen (Periphere mononukleäre Blutzellen, PBMC). Es folgten eine zweistündige Koinkubation mit Effektorzellen und danach die Durchführung des PanToxiLux-Assay. Die Abgrenzung der Target- und Effektorzellen wurde mithilfe des Lineage-Cocktails vorgenommen, apoptotische Zellen wurden mit *PanCyToxiLux™ Substrate* gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt sind n = 2 Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student´s t-Test. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet.

3.2.2 Einfluss von *GraB cells* auf die spezifische Lyse von allogenen PBMC durch zytotoxische T-Zellen

Das letztlich verwendete *in-vitro*-Modell zur Demonstration der immunsuppressiven Eigenschaften von *GraB cells* basierte auf dem beschriebenem Europium-Release-Assay (3.2.1). Es wurde um die Addition protektiver *GraB cells* erweitert, d.h. die den *GraB cells* zugrundeliegenden BC und die TC (Effektorzellen) stammten von jeweils einem Spender. Sie wurden gemeinsam stimuliert (TC-Aktivator bzw. B21) und für die Dauer von 48 h präinkubiert. PBMC allogener Herkunft dienten als Targetzellen. Eine *GraB cell*-induzierte TC-Suppression sollte sich in einer Hemmung der T-Zell-vermittelten Lyse der PBMC zeigen. Im Europium-Release-Assay waren demnach geringere Werte für die zeitaufgelöste Fluoreszenz (TRF) zu erwarten. Eine solche Abnahme der Spezifischen Lyse zeichnete sich orientierend unter dem Einfluss der *GraB cells* in einem Einzelversuch ab: Stieg das Verhältnis von B- zu T-Zellen, sank invers die spezifische Lyse (Abbildung 37), was tendenziell für einen immunsuppressiven Effekt der *GraB cells* sprechen könnte.

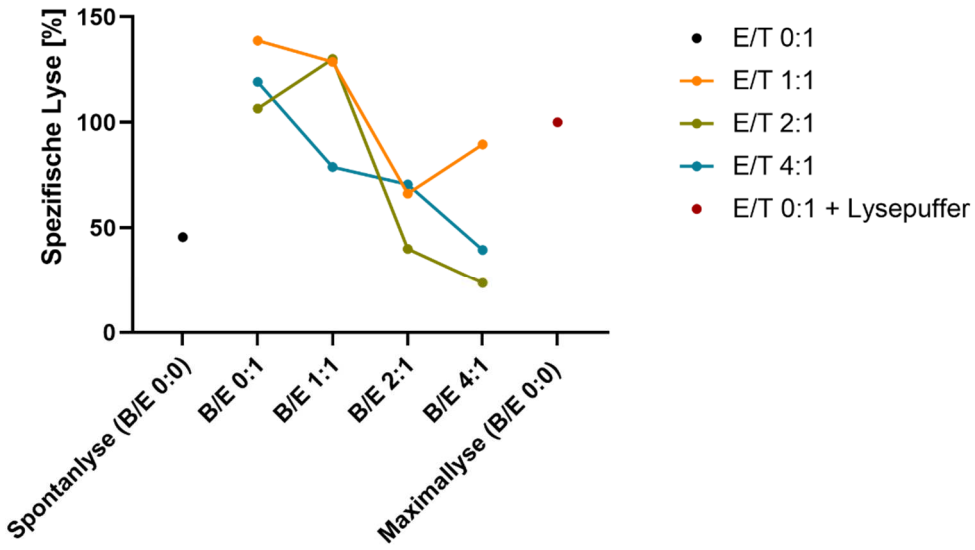


Abbildung 37 | Einfluss von *GraB cells* auf die T-Zell-vermittelte Lyse allogener peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC): Exemplarisch ist das Experiment V66 (n = 1; s. Anhang) dargestellt: B-Zellen (B) und T-Zellen (Effektorzellen) wurden aus einem Leukapheresat isoliert und in den Verhältnissen 0:1, 1:1, 2:1 und 4:1 miteinander inkubiert. Die B-Zellen wurden mit B21 (anti-BCR und Interleukin 21) stimuliert, um deren Differenzierung in Granzym B exprimierende regulatorische B-Zellen (*GraB cells*) zu induzieren. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Zugabe des T-Zell-Aktivators. Nach einem weiteren Tag Inkubation, wurden allogene periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC, Targetzellen) isoliert und für 2 h in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4 mit den gemischten T-Zell/*GraB cell*-Proben koinkubiert. Die Spontanlyse und Maximallyse enthielten nur Targetzellen, ohne Effektorzellen oder B-Zellen. Der Maximallyse war ein Lysepuffer zugesetzt. Das dargestellte Liniendiagramm zeigt die spezifische Lyse in Abhängigkeit vom Verhältnis von B-Zellen (B) zu T-Zellen (E) und T-Zellen (E) zu PBMC (T). Auf der X-Achse ist das Verhältnis von B-Zellen zu Effektorzellen aufgetragen. Das Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen ist der farbigen Legende am Bildrand zu entnehmen.

4 Diskussion

4.1 Induktion von *GraB cells*

4.1.1 Stimulation mit B21

Regulatorische Zellen sind ganz allgemein für ihre Fähigkeit zur Limitation der Immunantwort, zur Förderung von Selbsttoleranz und zur Begrenzung von Autoimmunität bekannt. Zahlreiche klinische Studien erproben bereits den Einsatz *regulatorischer T-Zellen* bei inflammatorischen, autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen [89, 119, 138]. In den letzten Jahren richtete sich das Augenmerk zunehmend auch auf die Erforschung *regulatorischer B-Zellen*. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jahrsdörfer identifizierte 2006 einen neuartigen regulatorischen BC-Subtyp. Im Zentrum seiner immunregulatorischen Aktivität steht die Serinprotease Granzym B.

Als Standardverfahren zur Generierung solcher *GraB cells* wurde die Stimulation mit B21 identifiziert. Ihre Zusammensetzung wurde in verschiedenen Forschungsarbeiten variiert und diskutiert. Der Identifikation von *GraB cells* gingen hierbei Experimente zur Induktion von GrB in B-CLL-Zellen voraus. In diesen konnte Granzym B über Stimulation des BCRs induziert werden. Zudem wurde auch in B-CLL-Zellen bereits IL-21 als wichtiger Cofaktor identifiziert. IL-21 war in der Konzentration 100 ng/ml beigefügt. Die so induzierten GrB-exprimierenden Zellen waren in der Lage, Apoptose in unbehandelten B-CLL-Zellen zu induzieren. Ebenso wie durch anti-BCR-Stimulation konnte durch CpG-ODN 2006 (2,5 µg/ml) in Kombination mit IL-21 eine Granzym B-Expression erzielt werden [70]. Mit der nachfolgenden Entdeckung von *GraB cells* auch im Gesunden wurde *B21* fortan als Stimulation mit anti-BCR-Fragmenten in der Konzentration 6,5 µg/ml und IL-21 in der Konzentration 50 ng/ml definiert. Unter diesem Stimulus konnten große Mengen an *GraB cells* induziert werden und eine dämpfende Wirkung der *GraB cells* auf antivirale [55, 76] und antineoplastische Immunantworten [85] beobachtet werden. Zahlreiche unabhängige Labore übernahmen dieses Protokoll für die Stimulation mit anti-BCR (6,5 µg/ml) und IL-21 (50 ng/ml) zur Induktion Granzym B-exprimierender B-Zellen [27, 28, 79, 114, 152]. Beispielsweise stellte die Arbeitsgruppe um Zeher auf dieser Grundlage einen Zusammenhang zwischen $CD5^+GrB^+$ BC und dem primären Sjögren Syndrom her [114]. Weiter berichteten Bulati und Kollegen unter besagter Stimulation von der Transformation

IgD⁻CD27⁻ *memory cells* in GrB-exprimierende BC und demonstrierten so einmal mehr die Wirksamkeit von B21 hinsichtlich der Induktion von GrB [19].

Kontrovers diskutiert wird seither der Einfluss von CD40-Ligand auf die Induktion von regulatorischen B-Zellen. In den Studien des Labors von Prof. Jahrsdörfer führte die Stimulation mit B21 in Abwesenheit von CD40-Ligand zur Ausbildung von *GraB cells.* Die gleichzeitige Stimulation mit B21 und CD40-Ligand (100 ng/ml) bewirkte dagegen eine signifikante Abnahme GrB⁺ BC. Zudem stieg unter dem Einfluss von CD40-Ligand die Expression des Plasmazellmarkers CD38 auf den untersuchten BC an [54, 56]. Außerdem ist bekannt, dass IL-21 plus CD40-Ligand und anti-BCR Plasmazellen induzieren [40, 113]. In Zusammenschau aller Ergebnisse wurde gefolgert, dass B21 als Goldstandard zur Induktion von *GraB cells* gelten darf. CD40-Ligand dagegen präsentierte sich als Differenzierungsfaktor von Plasmazellen bzw. als Gegenspieler von *GraB cells* [53-55, 71, 76]. In Einklang mit diesen Ergebnissen wiesen periphere B-Zellen HIV-infizierter Patienten eine verminderte Expression von CD40-Ligand bei einem zugleich erhöhten Prozentsatz an *GraB cells* auf. Die Zugabe eines multimeren CD40-Liganden in einer Dosierung von 0,5 µg/ml äußerte sich hierbei *in-vitro* in einer Abnahme GrB⁺ BC und einer Zunahme an Plasmazellen. Gestützt wird diese Hypothese auch durch den Befund, dass sich eine NEMO-Mutation im CD40-Signaling eines immundefizienten Patienten ebenfalls in einer Überexpression von *GraB cells* manifestierte [76]. Zu gleichem Ergebnis, nämlich dass CD40-Ligand die Induktion GrB-exprimierender BC hemmt, kamen viele unabhängige Arbeitsgruppen [7, 19, 114, 152, 166]. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Ghaderi et al. im Rahmen des Mammakarzinoms PBMC aus axillären Lymphknoten und stimulierte diese mit B21 in An- und Abwesenheit von CD40-Ligand. Letzterer inhibierte in diesem Kontext die Induktion der Granzym B-Expression [7]. Auch in einer Studie mit nierentransplantierten Patienten wurde eine Überlegenheit der Stimulation mit B21 gegenüber einer Stimulation mit IL-21 und CD40-Ligand zur Generierung GrB⁺ BC beschrieben [166].

Die Arbeitsgruppe um Chesneau und Brouard ist hinsichtlich des Einflusses von CD40-Ligand und der idealen Stimulation Granzym B-exprimierender BC dagegen anderer Auffassung. Die AG beobachtete eine Suppression von TC im Beisein CpG-CD40-prästimulierter BC. Da dieser Effekt unter Zugabe von Granzym B-Inhibitor reversibel war, wurde die TC-Suppression im Umkehrschluss auf Granzym B-

exprimierende BC zurückgeführt [29]. Bei gleichzeitiger Detektion einer vermehrten Expression von CD27, CD38 und CD138 in GrB^+ BC, postulierten Chesneau und Kollegen eine Induzierbarkeit regulatorischer, plasmablastartiger GrB^+ BC u. a. durch CD40-Ligand. In Anlehnung an Le Gallous zweizeitiges Stimulationsvorgehen zur Induktion von Plasmablasten vom $CD20^{low}CD38^{high}$-Typ [82], modulierte die AG um Chesneau ihr Konzept und publizierte im Januar 2021 ein Protokoll zur Expansion Granzym B-exprimierender BC. Das Protokoll sieht eine 1-3-tägige Stimulation von BC mit IL-21 (10 ng/ml), anti-BCR (5 µg/ml), CpG ODN 2006 (1 µg/ml), IL-2 (50 IU/ml) und CD40-Ligand (50 ng/ml) vor. Unter Verwendung isolierter B-Zellen sollten sich gemäß den Angaben des Protokolls mehr als 90% der BC zu GrB-exprimierenden BC transformieren lassen [27]. Stellt man diese Stimulation der des Labors von Prof. Dr. Jahrsdörfer gegenüber, so könnte man vereinfacht sagen, dass B21 um CpG, IL-2 und CD40-Ligand erweitert wurde.

Die gegenläufigen Auffassungen bzgl. des Einflusses von CD40-Ligand innerhalb der verschiedenen Forschungsgruppen könnte auf methodische Unterschiede, angefangen bei den verwendeten Materialien, zurückzuführen sein. Während die AG Jahrsdörfer *AIM V*-Medium verwendete, kam bei Chesneau et al. RPMI 1640 zum Einsatz, das mit 10 % fetalem Kälberserum (*FCS*) supplementiert war. Vorarbeiten im Labor von Herrn Prof. Dr. Jahrsdörfer zeigten eine starke Abhängigkeit der Induzierbarkeit von *GraB cells* vom verwendeten Medium und seinen Zusätzen. Die Hinzugabe von Humanalbumin führte beispielsweise zu einer Abnahme des Anteils GrB-positiver BC. *FCS* dagegen wirkte sich positiv auf die Induktion der *GraB cells* aus (Ergebnisse bisher unveröffentlicht). Die beobachteten Unterschiede in der Induktion Granzym B-exprimierender BC könnten also durch die Wahl des Mediums beeinflusst worden sein. Möglicherweise verschleierte der Einsatz *FCS*-versetzten Mediums den Einfluss von CD40-Ligand.

Um eine eindeutige Aussage über die Auswirkungen von CD40-Ligand treffen zu können, ist eine Mitführung und Gegenüberstellung von Kontrollen ohne CD40-Ligand notwendig. Da eben solche Kontrollproben in Chesneaus Experimenten fehlten, kann auf der Basis dieser Experimente alleine nicht zweifelsfrei beurteilt werden, ob er induzierend oder inhibierend auf die Ausbildung GrB-positiver BC wirkt. So ist es denkbar, dass die Induktion von GrB^+ BC bei Chesneau durch anti-BCR, CpG, IL-21 und IL-2 geschah. Da die Stimulation mit fünf Reagenzien entsprechend stark gewählt wurde, könnte es sein, dass CD40-Ligand im Verhältnis

zu niedrig dosiert war und seine inhibierende Wirkung daher in den Hintergrund trat. Ohnehin ist unter CD40-Ligation nicht von einer Differenzierung aller BC in Plasmazellen auszugehen. Ein Restbestand Granzym B-positiver BC ist wahrscheinlich. Dieser könnte den potentiell hemmenden Einfluss von CD40-Ligand zusätzlich maskiert haben.

Die geschilderte Kontroverse gab in der vorliegenden Arbeit Anlass dazu, die Wirksamkeit von B21-Stimulation und den Einfluss von CD40-Ligand abermals zu überprüfen. IL-21 erwies sich in den durchgeführten Experimenten als Grundvoraussetzung für die Erzeugung der *GraB cells*. Relevante Mengen an *GraB cells* ließen sich nur in Anwesenheit dieses Zytokins erzielen. Gleichzeitig steigerte es die Viabilität von B-Zellen und fungierte so auch als Überlebensfaktor. Die Zugabe von anti-BCR (B21) erwies sich als sehr wirksam zur Induktion von *GraB cells***.** In mehr als zehn Versuchen konnten hierdurch im Schnitt mehr als 25% aller B-Zellen zu *GraB cells* differenziert werden. Der beobachtete Effekt war hoch signifikant und konsistent über alle Versuche hinweg. Zudem konnte er inzwischen von einer Vielzahl unabhängiger Labore bestätigt werden [7, 79, 114, 118, 152, 166].

Im Unterschied zu den geschilderten Forschungsarbeiten konnte eine maximale GrB-Expression unter BC-Stimulation mit IL-21 in der Konzentration 100 ng/ml plus anti-BCR in der Konzentration 12 µg/ml beobachtet werden. Dies entspricht in etwa dem Doppelten der im Labor von Herrn Prof. Dr. Jahrsdörfer üblicherweise verwendeten Dosierung. Da die Induktion von *GraB cells* stark von externen Faktoren abhängig ist, könnte die Verschiebung des Maximums auf abweichende Materialien zurückzuführen sein. So wurde im Unterschied zu den beschriebenen Forschungsarbeiten serumfreies X-VIVO™ 15-Medium verwendet. Zudem stammten die verwendeten anti-BCR-Fragmente aus Ziegen und nicht aus Hasen. Eine positive Modulation der GrB-Parameter durch CD40-Ligand, wie sie durch die AG Brouard formuliert wurde, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Ohne CD40-Ligand induzierten B21 und P21 regulatorische *GraB cells*. Mit CD40-Ligand sank der Anteil an *GraB cells* ab. Aufgrund der niedrigen Anzahl der durchgeführten Experimente (n = 2) waren die Ergebnisse nicht signifikant. Dennoch stehen sie abermals mit den Ergebnissen der AG Jahrsdörfer in Einklang. In weiteren Versuchen könnte untersucht werden, wie sich Chesneaus Erweiterung der B21 Stimulation um CpG und IL-2 auf den Anteil an *GraB cells* auswirkt.

In diesem Zuge könnten Proben mit und ohne CD40-Ligand mitgeführt werden, um seinen Einfluss auf die gleichzeitige Stimulation mit fünf Reagenzien und die Induktion von *GraB cells* abschließend zu klären.

4.1.2 Alternative Wege zur Induktion von *GraB cells*

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Erforschung alternativer Stimuli zur Induktion von *GraB cells*. Hauptziel war es dabei, die Stimulation mit polyklonalen und xenogenen F(ab´)$_2$-Fragmenten gleichwertig zu ersetzen, um die Grundlage für eine GMP-konforme Induktion von *GraB cells* zu schaffen. Zu diesem Zweck wurde eine Vielzahl an Stimulanzien getestet: Ionomycin, LPS, PHA, Protein G, MPLA und GRP-78 blieben weitgehend wirkungslos. Protein A und Protein A/G vermittelten dagegen induktive Funktionen. Sie wirken an den Fc-Regionen von Immunglobulinen, wobei sie eine besonders hohe Affinität für IgG besitzen, während IgM und IgA weniger stark gebunden werden. Protein A/G erzielte einen stärkeren Effekt als Protein A. Dies könnte auf das breitere Bindungsspektrum des Fusionsproteins (Protein A/G) zurückzuführen sein [124]. Dennoch waren sowohl Protein A als auch Protein A/G der B21-Kontrolle unterlegen. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass sich die leichten Ketten der Fab-Region des BCR besser für die Induktion von *GraB cells* eignen als die Fc-Region, an der die genannten Proteine wirken.

4.1.2.1 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat als Induktor regulatorischer B-Zellen

Deutlich stärkere Effekte zeigten sich in den durchgeführten Experimenten bei Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat. Die Zielgrößen, GrB^+ Anteil und MFI, wurden durch PMA signifikant gegenüber der IL-21-Kontrolle gesteigert ($p < 0,05$). Maximale Werte erzielte die Kombination aus PMA 50 ng/ml und IL-21 100 ng/ml. Im Schnitt exprimierte unter dieser Stimulation nach 48 h mehr als ein Drittel aller B-Zellen GrB. Damit übertraf der durchschnittliche induktive Effekt von PMA den von B21 um mehr als 8 Prozentpunkte. Die Viabilität der BC blieb von der PMA-Stimulation unbeeinträchtigt. Auch bei Verwendung von PMA war der Zusatz von IL-21 für die Generierung von *GraB cells* elementar, vorausgesetzt CD40-Ligand war abwesend. Bei Zugabe von CD40-Ligand (25 ng/ml) kam es hingegen zu einer Abnahme der GrB-Expression. Dies unterstützt einmal mehr die Hypothese, dass *GraB cells* sich eher in Abwesenheit komplett aktivierter TC bilden. Innerhalb unserer Stichprobe ($n > 10$) waren die Ergebnisse stabil und signifikant. Um valide Aussagen zu treffen, ist eine Vergrößerung der Stichprobenzahl im Rahmen weiterer unabhängiger Experimente notwendig. Dennoch ist die Konsistenz der Ergebnisse als starkes Indiz für eine Gleichwertigkeit oder sogar Überlegenheit der *GraB cell*-Induktion mittels PMA gegenüber der mit anti-BCR zu werten.

Die Wirkung von PMA auf B-Zellen könnte in seiner strukturellen Analogie mit Diacylglycerol (DAG) begründet liegen. Als *second messenger* aktiviert DAG in B-Zellen die Proteinkinase C und reguliert im weiteren Verlauf essentielle Transkriptionsfaktoren wie NFAT, Myc, NF-kB und AP-1 [32]. Diese Transkriptionsfaktoren bestimmen wiederum die Genexpression, u. a. auch die von GrB-Genen. Eine parallele Wirkungsweise und ein paralleles Wirkungsspektrum für PMA erscheinen in Anbetracht seiner strukturellen Ähnlichkeit mit DAG folgerichtig (s. Abbildung 3, 4). So überrascht es nicht, dass PMA in regulatorischen T-Zellen und in NK-Zellen eine PKC-Aktivierung mit nachfolgender GrB-Degranulation initiieren kann. Die Transkription der GrB-Gene unterlag dabei ebenfalls PKC-reguliertem NF-kB [64]. Eine Induktion von *GraB cells* durch PMA, wie sie in den durchgeführten Experimenten beobachtet werden konnte, erscheint unter diesem Gesichtspunkt plausibel.

PMA ist im Bereich regulatorischer Zellen kein gänzlich unbekannter Akteur. Die Entwicklung von B10-Zellen erfolgt unter Ausbildung mehrerer Zwischenstadien. Tedder und Kollegen folgend vollziehen sich erste Reifungsschritte von $B10_{PRO}$-Zellen unter CD40-Ligation oder TLR-Stimulation. Der Einfluss des BCR ist hierbei noch nicht abschließend geklärt. Die Ausbildung kompetenter B10-Zellen und die Sekretion von IL-10 geschah *in-vitro* u.a. unter Stimulation mit LPS und PMA [75, 87, 91, 155]. Zur Induktion immunkompetenter muriner B10-Zellen wurde deshalb ein zweizeitiges Stimulationsvorgehen gewählt. Im Anschluss an eine 48-stündige Stimulation mit CD40-Ligand erfolgte eine kurze Stimulation (5 h) mit LPS, PMA und Ionomycin [75]. Auf diese Weise konnten murine regulatorische B10-Zellen mit einem $CD1d^{+}CD5^{+}CD19^{hi}$ Phänotyp induziert werden.

Dieses Mehrphasenmodell zur Induktion regulatorischer B10-Zellen wird auch für humane B10-Zellen diskutiert und fand beispielsweise in Studien zur Rheumatoiden Arthritis Anwendung. Hierbei erfolgte die erste Phase der Stimulation peripherer BC mit CpG (und/oder anti-BCR oder CD40L) für 24 h. Für die letzten 4 h der Kultivierung wurden PMA, Ionomycin und Brefeldin A hinzugefügt. Patienten mit Rheumatoider Arthritis wiesen in diesem Zusammenhang ein quantitatives Defizit an B10-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen auf [31]. PMA kam darüber hinaus auch in Restimulationsversuchen zur Aufrechterhaltung der IL-10-Produktion in humanen B10-Zellen zum Einsatz. Dabei konnte eine kleine Fraktion ehemals IL10-negativer B-Zellen zur IL-10-Produktion angeregt werden [84]. Aus den geschilderten Studien ließe sich der Schluss ziehen, dass PMA eine wichtige Funktion in der Ausbildung *regulatorischer Zellen* inne hat. Ähnlichkeiten zwischen B10-Zellen und *GraB cells* implizieren eine Übertragbarkeit dieses Triggers auf die Induktion von GrB. Die Vielzahl an Studien, die PMA und Immunregulation in einen Kontext stellt, untermauert schlussendlich die Plausibilität der beobachteten Induktion von *GraB cells* durch PMA, auch wenn letzteres bisher meist nicht als Hauptstimulus diente.

4.1.2.2 Potentielle Nebenwirkungen PMA-induzierter *GraB cells*

Die Verwendung von PMA zur Generierung eines Immunzelltherapeutikums ist aufgrund seiner pleiotropen Wirkungsweise sorgfältig abzuwägen. An B-Zellen wirkt PMA, wie bereits ausgeführt, als treibende Kraft zur Generierung regulatorischer *GraB cells*. An $CD4^+$ T-Zellen bewirkt PMA die Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen. U. a. induziert PMA den IL-21 Promotor und stellt somit eben jenes Zytokin bereit, das für die Induktion von *GraB cells* unentbehrlich ist [94, 110, 115]. In der Theorie wäre aufgrund der beschriebenen Effekte und der langen Halbwertszeit von PMA (> DAG) von einer ausgeprägten Wirkstärke auszugehen. Es ist jedoch zu bedenken, dass durch PMA im Sinne eines Zytokinsturms (*Cytokine Release Syndrome*, CRS) neben IL-21 weitere Zytokine wie IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α und IFN-γ freigesetzt werden könnten [80, 120, 154]. Die Folgen konnten u.a. in einer Studie aus dem Jahr 1998 beobachtet werden [59]. Bei dieser Studie wurden 12 Patienten mit einer therapierefraktären malignen Erkrankung (CML, AML, MDS) mit PMA alleine oder in Kombination mit Cytosin-Arabinosid und Vitamin D_3 behandelt. Pro Woche wurden so 0,25-1 mg PMA als Infusion mit 200 ml Kochsalzlösung appliziert (Laufzeit 1 h). In der Folge wurden milde grippeartige Symptome beobachtet. Dazu gehörten Schüttelfrost, Fieber und Schweißausbrüche für 3-5 h. Daneben wurden teils kurzzeitige Episoden (10-20 min) von Atemnot, aber auch Hämoglobinurie und Proteinurie für die Dauer eines Tages beobachtet. Ein Patient zeigte darüber hinaus Blutungszeichen [59]. Zwei weitere Studien berichteten von ähnlichen Nebenwirkungen [58, 132]. Da es im Rahmen eines *Cytokine Release Syndrome* aber auch zu schwerwiegenden unerwünschten Reaktionen wie Kreislaufschock, Verbrauchskoagulopathie und Multiorganversagen kommen könnte, erscheint ein direkter systemischer Einsatz kontraindiziert. Dagegen wäre ein Einsatz *ex-vivo* im Rahmen eines GMP-konformen Herstellungsprozesses im Hinblick auf die oben genannten Wirkungen eher vertretbar, da das finale zelluläre Präparat, wenn überhaupt nur noch Spuren von PMA enthalten würde.

Auch vor dem Hintergrund seines mitogenen Einflusses muss PMA kritisch beleuchtet werden. Phorbolester wie PMA sind im Mehrstufenmodell zur Kanzerogenese als tumorpromovierende Substanzen eingestuft [65]. Demonstriert wurde dies an einem Modell zur Ausbildung muriner Hauttumore. Der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff 7,12-Dimethylbenzo(a)anthracen (DMBA) bewirkte

als subkanzerogener Stimulus eine initiale Zelltransformation. Rezidivierende Applikationen von PMA als tumorpromovierendem Wachstumsreiz führten nachfolgend zur Ausbildung von Papillomen [4, 17, 47, 126]. Eine maligne Progression fand nur unter Addition einer weiteren subkanzerogenen Dosis von DMBA statt. Paradoxerweise vermittelte PMA in einigen malignen Neoplasien hingegen sogar tumorsuppressive Effekte. So wurde beispielsweise in einer Studie an entarteten Prostatazellen unter PMA-Stimulation eine Aufregulation pro-apoptotischer (JNK, p53) und eine Inhibition proliferierationsfördernder Signale (E2F1) dokumentiert [67]. Überdies konnten antileukämische Effekte im Zusammenhang mit myeloischen Leukämien sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* demonstriert werden [23, 163]. Die intravenöse Applikation von PMA bei Patienten mit CML, AML oder MDS bewirkte hierbei eine Reduktion leukämischer Blasten. Teilweise konnte dadurch eine (partielle) Remission und eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten erzielt werden [59, 132]. Ähnliche Anti-Tumor-Effekte sind auch für einige B-Zell-Malignome beschrieben [48]. So induzierten PMA und Ionomycin Apoptose in OCI-LY1-Zellen des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) [157]. Auch HT58-Zellen eines humanen Non-Hodgkin-Lymphoms verblieben bei Behandlung mit PMA zeitweise in einem G1-Arrest und zeigten daneben eine erhöhte Sensitivität für Staurosporin-bedingte Apoptose [97, 98].
Letztlich sind die Umstände und Faktoren, unter denen PMA pro-apoptotisch oder tumorpromovierend wirkt, noch nicht eindeutig geklärt. Um einen Zytokinsturm und mögliche tumorpromovierende Effekte sicher zu vermeiden, sollte daher ein *ex-vivo*-Verfahren angewandt werden. Unter sorgfältiger Beseitigung von PMA-Rückständen und einer strengen Qualitätskontrolle der *GraB cells* im Vorfeld der Transfusion sollte das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen in einem vertretbaren Rahmen bleiben.

4.1.2.3 PMA in einem GMP-konformen *ex-vivo*-Verfahren zur Induktion von *GraB cells* als Immunzelltherapeutikum

Die *Gute Herstellungspraxis* (GMP) der Europäischen Kommission definiert Richtlinien für die Herstellung von Arzneimitteln zur Gewährleistung der Produktqualität und -sicherheit. Xenogene Materialien sind dabei aufgrund möglicher unerwünschter Immunreaktionen und Einbußen der Wirksamkeit auf humane Zellen möglichst zu vermeiden. In der Entwicklung therapeutischer Antikörper wurden xenogene Antikörper deshalb zunehmend humanisiert. Der bislang verwendete Standard zu Generierung von *GraB cells* basiert jedoch auf xenogenen F(ab)´$_2$ Fragmenten der Ziege. Die Arbeitsgruppe um Sophie Brouard veröffentlichte im Januar 2021 ein Protokoll zur Expansion und Induktion Granzym B-exprimierender B-Zellen. Hierbei wurde eine anti-BCR-basierte Zelltherapie mit GrB$^+$ Bregs *in-vivo* in Aussicht gestellt [27, 28]. In Anbetracht möglicher immunogener Nebenwirkungen wäre von einer solchen Zelltherapie unter Umständen jedoch abzuraten. Eine diesbezüglich sicherere und zugleich GMP-konforme Alternative könnte die Induktion von *GraB cells* mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat in einem *ex-vivo*-Verfahren darstellen.

Der erste Schritt in einem solchen *ex-vivo*-Verfahren besteht in einer autologen oder allogenen (HLA-gematchten) Lymphozytapherese. T-Zellen könnten in einem solchen Verfahren CD3-abhängig depletiert und BC über CD19 angereichert werden. Anschließend könnte die Stimulation von BC mit PMA in einer Konzentration von 50 ng/ml und rekombinantem IL-21 in einer Konzentration von 100 ng/ml im Reinraum durchgeführt werden. Die Kultivierung würde für 2 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit erfolgen. In diesem Zeitraum würden die B-Zellen im Optimalfall ihre regulatorischen Eigenschaften erlangen. Die so entstandenen *GraB cells* müssten anschließend mehrmals gewaschen werden, um das applizierte PMA zu beseitigen und potentielle systemische Nebenwirkungen zu verhindern. Nach umfangreichen Qualitätskontrollen (BacT/Alert, Mykoplasmen- und Endotoxintestung) könnte dann die (Re-) Transfusion der *GraB cells* erfolgen (s. Abbildung 2). In diesem Kontext gilt es in weiteren Experimenten Verfahren für die Detektion und Beseitigung möglicher PMA-Rückstände zu erforschen. Unter diesen Voraussetzungen erscheint der Einsatz von GMP-konform hergestellten, PMA-induzierten *GraB cells* sicher und der Verwendung von anti-BCR möglicherweise sogar überlegen.

4.1.3 Phänotypisierung von *GraB cells*

Zur Charakterisierung von *GraB cells* wurde eine Reihe von Oberflächenmarkern untersucht. Von Interesse waren u. a. Veränderungen, die unter B21-, PMA- oder Protein A/G-Stimulation parallel zur Induktion von *GraB cells* erzielt wurden. Im Rückschluss erlaubten diese Veränderungen eine Aussage über den Phänotyp von *GraB cells*. Es ließ sich feststellen, dass CD20 und MHC I im Zuge der Induktion von *GraB cells* in geringerem Ausmaß exprimiert wurden. Die Oberflächenmarker CD5, CD25, CD71, CD80, CD83, CD86, CD147, CD274 und MHC II wurden dagegen durch die Induktoren weitgehend positiv reguliert.

Ausgehend von späten Pro-B-Zellen wird CD20 im Laufe der Hämatopoese konstitutiv exprimiert. Plasmablasten und Plasmazellen heben sich von ihren Vorläufern durch den Verlust von CD20 ab. Die beobachtete verminderte Expression von CD20 auf *GraB cells* spricht daher für eine plasmablastartige Morphologie von *GraB cells*. Passenderweise detektierte die Arbeitsgruppe um Sophie Brouard Granzym B vermehrt in Plasmablasten und *memory cells* [28]. Ferner beschrieben Xu und Kollegen in humanem tonsillären Gewebe einen plasmazellartigen GrB^+ BC-Subtyp unklarer Funktionalität [153]. Auch für regulatorische B10-Zellen ist eine ähnliche Morphologie beschrieben. Patienten mit cGvhD wiesen dabei eine niedrigere Zahl dieser plasmablastartigen B10-Zellen gegenüber gesunden Probanden auf [35]. Vor diesem Hintergrund erscheint die Herunterregulation von CD20 als Reaktion auf B21, Protein A/G bzw. P21 ein mit der Differenzierung von *GraB cells* vergesellschaftetes Phänomen zu sein, da sie im Rahmen dieser Arbeit in mehr als 10 Experimenten konsistent auftrat. Die verminderte Expression von CD20 könnte damit ein weiteres Charakteristikum von GrB^+ regulatorischen B-Zellen repräsentieren. In Kontrast zu den Beobachtungen in dieser Arbeit erzielten Lindner und Kollegen eine signifikante Zunahme von CD20 unter B21-Stimulation [85]. Unterschiede bestanden in den verwendeten Zellen (PBMC) und in der Kultivierungsdauer (4 d). Es wäre theoretisch denkbar, dass die hier beobachtete Herabregulierung von CD20 nicht in *GraB cells* sondern in einem anderen BC-Subtyp stattgefunden hat. Umgekehrt wäre es möglich, dass von Lindner verwendete PBMC untereinander interagierten und zu einer gesteigerten Proliferation weiterer Subtypen führten. Die Hochregulation von CD20 müsste demnach nicht zwangsläufig auf *GraB cells* erfolgt sein. Um obligate Aussagen über die CD20-Expression auf *GraB cells* treffen zu können, sollte die CD20-MFI

zukünftig innerhalb GrB^+-gegateter BC ermittelt werden. Sinnvoll wäre in diesem Zuge eine Gegenüberstellung der Induktion von GrB in PBMC und BC unter Einbeziehung variierender Inkubationszeiten.

Von besonderer Relevanz könnte ferner die induzierte Aufregulation der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 sein. Dies sind kostimulatorische Moleküle, die regelhaft auf aktivierten Lymphozyten exprimiert werden und bezeichnend für das Maß an Costimulationsfähigkeit stehen. CD80 und CD86 interagieren mit co-stimulatorischen bzw. co-inhibierenden Molekülen auf TC. Die Interaktion mit CD28 hat dabei einen stimulierenden, die Interkation mit CTLA4 einen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation von TC. Blair et. al. beschrieben im Zusammenhang mit $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ B10-Zellen eine TC-Suppression, die u. a. auch von CD80 und CD86 abhing. Die Zugabe CD80- und CD86-blockierender Antikörper resultierte in einer Abnahme der suppressiven Kapazitäten der Bregs gegenüber TC [15]. Die auf *GraB cells* exprimierten Marker CD80 und CD86 könnten folglich im Dienst der Immunregulation stehen. Womöglich wird ein Teil der immunsuppressiven Funktionen von *GraB cells* über die Aufregulation von CD80 und CD86 erzielt. Die vorliegenden Daten sind aufgrund der geringen Stichprobengröße zwar nur als Indiz zu sehen, passen jedoch insgesamt in das Gesamtbild von Bregs.

Eine besonders ausgeprägte Reaktion auf PMA im Vergleich zu B21 zeigte die Expression von CD147. Für dieses Oberflächenmolekül sind mannigfaltige Effekte beschrieben: Bedeutend für regulatorische Zellen ist v.a. die auf CD147 zurückzuführende Suppression des T-Zell-Rezeptors [106]. Beschrieben ist, dass CD147 oder auch Basigin, den Ca^{2+}-Einstrom hemmt und hierdurch die TC-Aktivierung inhibiert [159]. Für *GraB cells* selbst ist gesichert, dass sie die ζ-Kette des TCR GrB-abhängig degradieren und so die TC-Antwort supprimieren [85, 129]. CD147 und GrB in *GraB cells* setzen insofern beide am TCR an und könnten daher synergistisch wirken. Interessanterweise wird CD147 auch auf regulatorischen T-Zellen stark exprimiert. CD147 könnte somit generell ein wichtiger Akteur in der Vermittlung immunregulatorischer Effekte sein. Die Tatsache, dass PMA in Verbindung mit IL-21 CD147 signifikant heraufreguliert, bestätigt seine Bedeutung als potenter Induktor von *GraB cells*.

Ähnliches ist für CD274 (PD-L1) denkbar. Es zeigte ebenfalls eine Regulierbarkeit durch PMA- und B21. PD-L1 wirkt über seine Interaktion mit PD-1 auf TC

immunsuppressiv. Es könnte damit als Mediator oder Verstärker des antiproliferativen Effekts von *GraB cells* fungieren. Ein paralleler Anstieg von GrB und CD274, wie er in den durchgeführten Experimenten zu beobachten war, erscheint daher plausibel. Auch CD25, die alpha Kette des IL-2 Rezeptors, steht im Dienste TC-suppressiver Eigenschaften. So exprimieren sowohl Tregs als auch einige Subtypen an Bregs typischerweise CD25 [83]. Die beobachtete Aufregulation auf *GraB cells* entspricht publizierten Daten [85]. Eine neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass auch PMA in Verbindung mit IL-21 eine Aufregulation von CD25 und CD247 induzierte.

Zuletzt zeichnete sich in den hier präsentierten Experimenten eine positive Regulation von CD1d ab. Dies ist ein unkonventionelles MHC-Molekül, welches vor allem auf Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Durch Interaktion mit NKT-Zellen (TCR), kann es die Freisetzung vielzähliger Zytokine induzieren, darunter IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 und IL-21 [26, 88, 136]. Da IL-21 der limitierende Faktor bei der Differenzierung von *GraB cells* ist, könnte CD1d hier im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus die Induktion von *GraB cells* und anderen regulatorischen Zellen wie Tregs verstärken. So konnte in einem murinen Modell der Myasthenia gravis gezeigt werden, dass CD1d die Präsentation von α-GalCer vermittelt. Dies hatte die Aktivierung von Tregs mit nachfolgender Hemmung des Krankheitsprogresses zur Folge [136]. Eine ähnliche Wirkungsweise wäre daher unter Umständen auch für *GraB cells* denkbar.

4.2 Einflussnahme von *GraB cells* in einem allogenen *in-vitro*-GvHD-Modell

4.2.1 PanToxiLux-Assay

Zurückliegende Forschungsarbeiten untersuchten und diskutierten die immunsuppressiven Eigenschaften von *GraB cells* hinsichtlich ihrer Einflussnahme in Autoimmunerkrankungen [53], malignen Neoplasien [85], Virusinfektionen wie HIV [76] und GvHD [54]. Mit einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) sollte in der vorliegenden Arbeit ein allogenes Immungeschehen wie bei der GvHD simuliert werden. Ziel war es, mithilfe des PanToxiLux- und Europium-Release-Assays den protektiven Einfluss von *GraB cells* nachzustellen.

Zunächst war ein Nachweis der Zytotoxizität von T-Zellen gegenüber allogenen PBMC in diesem Modell zu erbringen. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß eine Abhängigkeit der allogenen Lyse vom Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen. Eine steigende Zahl an Effektorzellen führte zu einem Anstieg der allogenen Lyse von PBMC. Da Targetzellen und Effektorzellen von unterschiedlichen Spendern stammten, war dieses Ergebnis zu erwarten. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl (n = 2) waren die Ergebnisse allerdings nicht signifikant. Zudem stellte eine Vielzahl an Störfaktoren und methodischen Komplikationen die Aussagekraft der Ergebnisse in Frage, obwohl das Prinzip des PanToxiLux-Assays einfach erscheint - Targetzellen werden mittels TFL4 gefärbt und können so von Effektorzellen und BC abgegrenzt werden. Als Indikator für die Apoptose wird das fluoreszierende Substrat *PS* eingesetzt, welches Caspasen färbt und damit den Zelltod nachweist. Obwohl apoptotische Zellen mit dem verwendeten Caspase-Substrat gut darstellbar waren, konnten apoptotische Zellen mit dem Assay nicht verlässlich identifiziert werden, da die Abgrenzung der unterschiedlichen Zelltypen mittels TFL4 nicht hinreichend funktionierte. Dies lag daran, dass zum einen die Targetzellen nicht komplett gefärbt wurden, und dass zum anderen apoptotische und damit FITC-positive Zellen zu falsch positiven Signalen im APC (TFL4)-Kanal führten. Hierdurch konnten die Targetzellen letztlich nicht eindeutig identifiziert werden. Dieses Problem war als mögliche Komplikation im Datenblatt des Assays aufgeführt. Möglicherweise waren daher die ausgewählten Effektor- und Targetzellen für den Assay ungeeignet. Frühere Forschungsarbeiten erprobten den PanToxiLux-Assay zumeist mit Tumorzellen aus Zelllinien, wie K562-Zellen. Diese lassen sich durch ihre starken Unterschiede in Größe und Granularität von Lymphozyten deutlich leichter abgrenzen.

Mit der Verwendung eines Lineage-Cocktails wurde versucht, dem Problem der mangelnden Abgrenzbarkeit Abhilfe zu schaffen. Obwohl die Abgrenzung von Target- und Effektorzellen hierdurch besser gelang, gestaltete sie sich aufgrund hoher Spontanlyse-Raten immer noch problematisch. Ein Großteil der Versuche konnte daher nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Die Auswertung der PanToxiLux-Assays beschränkte sich damit auf zwei Versuche, in denen Abgrenzbarkeit und Spontanlyse angemessen waren, wodurch die Aussagekraft dieses experimentellen Teils der Arbeit deutlich eingeschränkt ist. Zwar zeichnete sich in den PanToxiLux-Versuchen ein plausibles Ergebnis ab, die methodische Problematik erforderte es jedoch, nach einer alternativen Methode zu suchen. Eine solche in der Immunologie weit verbreitete Methode ist der sogenannte Europium-Release-Assay.

4.2.2 Europium-Release-Assay

4.2.2.1 Methodendiskussion

Als besondere Herausforderung im Rahmen des Europium-Release-Assays erwies sich die optimale Präparation der PBMC. Vor allem Spontan- und Maximallyse lieferten uneinheitliche Ergebnisse. Nach Inkubation der Zellen mit Probenecid und den folgenden Waschgängen war die Ausbeute an Zielzellen oft zu gering. Die Spontanlyse und ihre Streuung waren meist sehr hoch. Selbst PBMC gleicher Spender, die zeitgleich und gleichartig verarbeitet wurden, wiesen bzgl. der Spontanlyse eine hohe Schwankungsbreite auf (zum Teil zwischen 20% und 50%). Mikroskopisch zeichneten sich außerdem auch Einbußen in der Targetzell-Viabilität ab. Möglicherweise beeinträchtigte Probenecid von vornherein die Viabilität der PBMC. Hieraus könnte gefolgert werden, dass auch dieser Assay nicht optimal für PBMC als Zielzellen geeignet ist. Zudem wurde durch den verwendeten Lysepuffer teilweise keine ausreichende Maximallyse erreicht. Dies beeinflusste die Ergebnisse der spezifischen Lyse zusätzlich negativ. Um eine maximale Lyse zu gewährleisten, sollten in weiteren Experimenten versucht werden, alternativ auf Staurosporin auszuweichen. Zumindest in den PanToxiLux-Assays führte dies zu zuverlässigen Ergebnissen hinsichtlich einer nahezu vollständigen Apoptose der Zellen (> 90 %). Ob sich dies auch in einer verstärkten Zelllyse niederschlagen würde, müsste allerdings erst getestet werden.

4.2.2.2 Ergebnisdiskussion

Trotz all der Hindernisse zeigte die Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenz (TRF) in Bezug auf die Darstellung der TC-Lyse gegenüber allogenen PBMC einen logischen Sachverhalt: Die niedrigsten Werte zeigten sich in der Spontanlyse, gefolgt von den Testproben aus PBMC und TC (Spezifische Lyse), und der Maximallyse. Unter Einbeziehung der Ergebnisse des PanToxiLux-Assays könnte man in den dargestellten Experimenten ein hinreichendes Indiz für die Induktion von Apoptose in PBMCs durch allogene TC sehen.

Unter Zugabe von *GraB cells* zeigte sich lediglich in einem Einzelexperiment eine Abnahme der spezifischen TC-Lyse gegenüber spenderfremden PBMC. Dies könnte auf einen protektiven Einfluss von *GraB cells* hinweisen. Zusätzlich zeichnete sich eine Abhängigkeit der spezifischen Lyse vom Verhältnis von BC zu TC ab. Eine größere Zahl an B-Zellen bewirkten im Schnitt eine geringere TRF und eine geringere errechnete spezifische Lyse. Dies deckt sich mit der formulierten Hypothese und den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten. *GraB cells* könnten demnach einen antiproliferativen Effekt auf T-Zellen ausüben, der auf die Degradierung der ζ-Kette von T-Zellen durch GrB zurückzuführen ist. In der Folge könnten TC ihr zytotoxisches Potential gegenüber allogenen Zellen weniger stark entfalten [85]. Passende Bestätigungsversuche liegen aufgrund der erhöhten Spontanlyse-Raten nicht vor. Der Versuch warf folgende Fragen auf: Es blieb unklar, warum die Kontrollprobe aus B-Zellen und PBMC, sehr hohe Werte für die Lyse ergab. Zudem blieb die geringe Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Stimulation der *GraB cells* ungeklärt.

Die Ergebnisse des Europium-Release-Assays und des PanToxiLux-Assays können letztendlich die postulierte immunsuppressive Wirkung von *GraB cells* nicht eindeutig nachweisen, weshalb in weiteren Studien alternative Nachweismethoden für die immunsuppressive Aktivität herangezogen werden sollten. Zum Beispiel demonstrierten Proliferationsversuche mit CFSE in früheren Studien bereits die Wirkung von *GraB cells*. Die Suppressionsrate betrug hierbei bis zu 50 % [85]. Basierend auf dem Prinzip der Farbstoffverdünnung erprobten Chesneau und Kollegen anhand *CellTrace™ Violet* eine ähnliche Proliferationsanalyse als Nachweis des immunsupprimierenden Effekts GrB-exprimierender BC [27]. BC wurden hierbei für 18-24 h mit IL-21 (10 ng/ml), CD40-Ligand (50 ng/ml), CpG ODN 2006 (1µg/ml) und F(ab)´2-Fragmenten (5 µg/ml) prästimuliert und

anschließend für 3 Tage mit autologen oder allogenen TC kokultiviert. Die Proliferationsrate der TC konnte so effizient gesenkt werden [27, 28]. Die geschilderten Proliferations-Analysen sind als manifester Beweis für die immunsuppressive Potenz der regulatorischen GrB^+ BC dennoch unzulänglich. Erst die Inhibition einer zytotoxischen Effektor-Target-Interaktion durch Granzym B-exprimierende B-Zellen kann als eindeutiger Beweis ihrer spezifischen Wirksamkeit betrachtet werden. Die Erbringung dieses Beweises müsste also in weiteren *MLR*-Experimenten erfolgen. Hierzu könnte zukünftig beispielsweise der Lactat-Dehydrogenase-Assay erprobt werden. Eine besondere Bedeutung könnte zudem der funktionellen Untersuchung von *GraB cells* in einem Maus-Modell der GvHD zukommen. Eine solche Studie wird daher der nächste logische Schritt in Bezug auf die Entwicklung von *GraB cells* als neuartiges Zelltherapeutikum sein.

5 Zusammenfassung

Mit der Ausbildung von Plasmazellen und Gedächtniszellen bestimmen B-Zellen maßgeblich die humorale Immunantwort und das immunologische Gedächtnis. Neben diesen beiden Differenzierungswegen für B-Zellen existiert ein dritter Weg, der in der Entwicklung zu regulatorischen B-Zellen mündet. Ihre grundsätzliche Existenz wurde bereits in den 1970er Jahren nachgewiesen. Lange Zeit wurde vermutet, dass sie vor allem indirekt über die Freisetzung von Zytokinen in die Regulation des Immunsystems eingreifen, welche sodann auf T-Zellen und deren Proliferation einwirken. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus dagegen auf Granzym B-exprimierenden regulatorischen B-Zellen, sogenannten *GraB cells*. Diese wurden 2006 erstmals beschrieben und besitzen antivirale, anti-inflammatorische und antineoplastische Kapazitäten. Sie sind durch ihre Interleukin 21-abhängige Produktion und Freisetzung von Granzym B charakterisiert. Voraussetzung für die Induktion von *GraB cells* ist die Abwesenheit von CD40-Ligation. Über GrB degradieren *GraB cells* unter anderem die ζ-Kette des T-Zell-Rezeptors. Dadurch wirken sie direkt antiproliferativ auf T-Zellen und in der Folge immunsuppressiv. Für die Induktion relevanter Mengen an *GraB cells* bedarf es neben Interleukin 21 eines weiteren Stimulus´. Goldstandard hierfür waren bis dato stimulierende Antikörper oder $F(ab)_2$-Fragmente gegen den B-Zell-Rezeptor. Da diese aktuell nur in xenogener und polyklonaler Form verfügbar sind, ist GMP (*Good Manufacturing Practice*)-konforme Verwendung ausgeschlossen. Aus diesem Grund widmete sich die vorliegende Arbeit der Erforschung alternativer Stimuli - mit dem Ziel, anti-BCR gleichwertig zu ersetzen.

Protein G, Monophosphoryllipid A, Phytohämagglutinin, Ionomycin, GRP-78 und Lipopolysaccharide induzierten keine relevanten Mengen an Granzym B in B-Zellen. Protein A und Protein A/G erwiesen sich als mäßige Induktoren von *GraB cells*, unterlagen jedoch dem Goldstandard B21 (Stimulation mit anti-BCR und Interleukin 21). Ein Durchbruch gelang schließlich mit der Erprobung von Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA). Unter Zugabe des Phorbolesters konnten große Mengen an Granzym B in B-Zellen induziert werden. Sowohl der prozentuale Anteil an *GraB cells*, als auch die Menge an Granzym B pro Zelle stiegen PMA-abhängig signifikant an. Ein Optimum erzielte PMA in einer Konzentration von 50 ng/ml, kombiniert mit 100 ng/ml IL-21. Diese Kombination zeigte sich insbesondere auch gegenüber dem Goldstandard B21 als überlegen. Unspezifische Bindungen und

eine Beeinträchtigung der Viabilität durch PMA konnten ausgeschlossen werden. PMA konnte damit erstmals mit der Induktion von *GraB cells* in Verbindung gebracht werden.

Als GMP-konformer Induktor könnte PMA zukünftig zur Generierung therapeutischer *GraB cells* herangezogen werden. Letzteren wird ein großes Potential in der Behandlung hyperinflammatorischer, autoimmuner, infektiöser und ggf. auch neoplastischer Erkrankungen zugeschrieben. Im Falle der Behandlung der Graft-versus-Host-Disease könnten B-Zellen hierfür zunächst aus einem autologen oder HLA (Humane Leukozytenantigene)-gematchten allogenen Leukapheresat isoliert werden. Im Anschluss daran könnte im Reinraum die Induktion von *GraB cells* über Stimulation der B-Zellen mit PMA und rekombinantem humanen Interleukin 21 erfolgen. Nach (Re-) Transfusion der so hergestellten *GraB cells* würden diese dann im Idealfall alloreaktive T-Zellen supprimieren und damit eine GvHD unterdrücken.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit PMA als potenter Induktor von *GraB cells* identifiziert werden. Dies könnte ein wichtiger Schritt in Richtung der Entwicklung von *GraB cells* als immunmodulatorisches Zelltherapeutikum (ATMP) für die Behandlung einer Graft-versus-Host Erkrankungen oder anderer hyper-inflammatorische Erkrankungen sein.

6 Literaturverzeichnis

11. Alhabbab R, Blair P, Elgueta R, Stolarczyk E, Marks E, Becker P D, Ratnasothy K, Smyth L, Safinia N, Sharif-Paghaleh E, O'Connell S, Noelle R J, Lord G M, Howard J K, Spencer J, Lechler R I, Lombardi G: Diversity of gut microflora is required for the generation of B cell with regulatory properties in a skin graft model. Scientific reports, 5: 11554(2015)

2. Alhabbab R Y, Nova-Lamperti E, Aravena O, Burton H M, Lechler R I, Dorling A, Lombardi G: Regulatory B cells: Development, phenotypes, functions, and role in transplantation. Immunological Reviews, 292: 164-179(2019)

3. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A: IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. European Journal of Immunology, 28: 359-369(1998)

4. Allen S M, Florell S R, Hanks A N, Alexander A, Diedrich M J, Altieri D C, Grossman D: Survivin Expression in Mouse Skin Prevents Papilloma Regression and Promotes Chemical-induced Tumor Progression. Cancer Research, 63: 567-572(2003)

5. Allman D, Lindsley R C, DeMuth W, Rudd K, Shinton S A, Hardy R R: Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 167: 6834-6840(2001)

6. Andorsky D J, Timmerman J M: Interleukin-21: biology and application to cancer therapy. Expert Opinion on Biological Therapy, 8: 1295-1307(2008)

7. Arabpour M, Rasolmali R, Talei A, Mehdipour F, Ghaderi A: Granzyme B production by activated B cells derived from breast cancer-draining lymph nodes. Molecular Immunology, 114: 172-178(2019)

8. Asadullah K, Sterry W, Volk H D: Interleukin-10 Therapy - Review of a New Approach. Pharmacol Reviews, 55: 241-269(2003)

9. Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk H D, Döcke W D: IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. The Journal of clinical Investigation, 101: 783-794(1998)

10. Avery D T, Bryant V L, Ma C S, de Waal Malefyt R, Tangye S G: IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 181: 1767-1779(2008)

11. Banchereau J, de Paoli P, Vallé A, Garcia E, Rousset F: Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. Science (New York, N.Y.), 251: 70-72(1991)

12. Baumgarth N, Tung J W, Herzenberg L A: Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Seminars in Immunopathology, 26: 347-362(2005)

13. Beutler J A, Alvarado A B, McCloud T G, Cragg G M: Distribution of phorbol ester bioactivity in the euphorbiaceae. Phytotherapy Research, 3: 188-192(1989)

14. Blair P A, Chavez-Rueda K A, Evans J G, Shlomchik M J, Eddaoudi A, Isenberg D A, Ehrenstein M R, Mauri C: Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 182: 3492-3502(2009)

15. Blair P A, Noreña L Y, Flores-Borja F, Rawlings D J, Isenberg D A, Ehrenstein M R, Mauri C: CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity, 32: 129-140(2010)

16. Bouaziz J, Yanaba K, Tedder T F: Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. Immunological Reviews, 224: 201-214(2008)

17. Boutwell R K, Sivak A: The Function and Mechanism of Promoters of Carcinogenesis. CRC Critical Reviews in Toxicology, 2: 419-444(1973)

18. Bryant V L, Ma C S, Avery D T, Li Y, Good K L, Corcoran L M, de Waal Malefyt R, Tangye S G: Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 179: 8180-8190(2007)

19. Bulati M, Buffa S, Martorana A, Candore G, Lio D, Caruso C, Colonna-Romano G: Trafficking phenotype and production of granzyme B by double negative B cells (IgG+IgD−CD27−) in the elderly. Experimental Gerontology, 54:123-129(2014)

20. Buzza M S, Zamurs L, Sun J, Bird C H, Smith A I, Trapani J A, Froelich C J, Nice E C, Bird P I: Extracellular Matrix Remodeling by Human Granzyme B via Cleavage of Vitronectin, Fibronectin, and Laminin. The Journal of Biological Chemistry, 280: 23549-23558(2005)

21. Caputo A, Garner R S, Winkler U, Hudig D, Bleackley R C: Activation of recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. The Journal of Biological Chemistry, 268: 17672-17675(1993)

22. Cariappa A, Pillai S: The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. Nature Reviews Immunology, 9: 767-777(2009)

23. Cartee L, Smith R, Dai Y, Rahmani M, Rosato R, Almenara J, Dent P, Grant S: Synergistic induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by phorbol 12-myristate 13-acetate and flavopiridol proceeds via activation of both the intrinsic and tumor necrosis factor-mediated extrinsic cell death pathways. Molecular Pharmacology, 61: 1313-1321(2002)

24. Carter N A, Vasconcellos R, Rosser E C, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, Ehrenstein M R, Flavell R A, Mauri C: Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 186: 5569-5579(2011)

25. Chang C, Furue M, Tamaki K: B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon-γ or by interleukin-10. European Journal of Immunology, 25: 394-398(1995)

26. Chaudhry M S, Karadimitris A: Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 193: 4761-4768(2014)

27. Chesneau M, Le Mai H, Brouard S: New Method for the Expansion of Highly Purified Human Regulatory Granzyme B-Expressing B Cells. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2270: 203-216(2021)

28. Chesneau M, Mai H L, Danger R, Le Bot S, Nguyen T, Bernard J, Poullaouec C, Guerrif P, Conchon S, Giral M, Charreau B, Degauque N, Brouard S: Efficient Expansion of Human Granzyme B-Expressing B Cells with Potent Regulatory Properties. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 205: 2391-2401(2020)

29. Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, Durand J, Braza F, Guerif P, Laplaud D, Soulillou J, Giral M, Degauque N, Chiffoleau E, Brouard S: Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. Journal of the American Society of Nephrology, 26: 2588-2598(2015)

30. Clarke C J P, Hales A, Hunt A, Foxwell B M J: IL-10-mediated suppression of TNF-α production is independent of its ability to inhibit NFκB activity. European Journal of Immunology, 28: 1719-1726(1998)

31. Daien C I, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, Morel J: Regulatory B10 Cells Are Decreased in Patients With Rheumatoid Arthritis and Are Inversely Correlated With Disease Activity. Arthritis & Rheumatology, 66: 2037-2046(2014)

32. Dal Porto J M, Gauld S B, Merrell K T, Mills D, Pugh-Bernard A E, Cambier J: B cell antigen receptor signaling 101. Molecular Immunology, 41: 599-613(2004)

33. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante N M, Ma X, Kubin M, Trinchieri G: Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. The Journal of experimental medicine, 178: 1041-1048(1993)

34. D'Angelo M E, Bird P I, Peters C, Reinheckel T, Trapani J A, Sutton V R: Cathepsin H Is an Additional Convertase of Pro-granzyme B. The Journal of Biological Chemistry, 285: 20514-20519(2010)

35. de Masson A, Bouaziz J, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, Rybojad M, Hau E, Monfort J, Branchtein M, Michonneau D, Dessirier V, Sicre de Fontbrune F, Bergeron A, Itzykson R, Dhédin N, Bengoufa D, Peffault de Latour R, Xhaard A, Bagot M, Bensussan A, Socié G: CD24hiCD27+ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Blood, 125: 1830-1839(2015)

36. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C G, de Vries J E: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. The Journal of Experimental Medicine, 174: 1209-1220(1991)

37. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M G, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries J E: Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. The Journal of Experimental Medicine, 174: 915-924(1991)

38. Ding L, Linsley P S, Huang L Y, Germain R N, Shevach E M: IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. Journal of Immunology, 151: 1224-1234(1993)

39. El-Mokhtar M A, Elsherbiny N M, Sayed D, Raafat D M, Askar E, Hussein A, Abdel-Malek M A Y, Shalaby A M: Altered Regulatory B Cell Subsets in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. Journal of immunology research, 2020: 1-8(2020)

40. Ettinger R, Sims G P, Fairhurst A, Robbins R, da Silva Y S, Spolski R, Leonard W J, Lipsky P E: IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. Journal of Immunology, 175: 7867-7879(2005)

41. Evans F J, Soper C J: The tigliane, daphnane and ingenane diterpenes, their chemistry, distribution and biological activities. A review. Journal of Natural Products, 41: 193-233(1978)

42. Evans G A, Farrar W L: Phorbol Esters. In: Delves P J (Hrsg) Encyclopedia of Immunology (Second Edition), Elsevier, Oxford, S. 1940-1942 (1998)

43. Evans J G, Chavez-Rueda K A, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings D J, Ehrenstein M R, Mauri C: Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 178: 7868-7878(2007)

44. Fillatreau S, Sweenie C H, McGeachy M J, Gray D, Anderton S M: B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nature immunology, 3: 944-950(2002)

45. Fiorentino D F, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann T R, Howard M, Moore K W, O'Garra A: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 146: 3444-3451(1991)

46. Froelich C J, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, Shah G M, Bleackley R C, Dixit V M, Hanna W: New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. The Journal of Biological Chemistry, 271: 29073-29079(1996)

47. Fürstenberger G, Berry D L, Sorg B, Marks F: Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78: 7722-7726(1981)

48. Goel G, Makkar H P S, Francis G, Becker K: Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. International journal of toxicology, 26: 279-288(2007)

49. Gondek D C, Lu L, Quezada S A, Sakaguchi S, Noelle R J: Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 174: 1783-1786(2005)

50. Griffiths G M, Isaaz S: Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. The Journal of Cell Biology, 120: 885-896(1993)

51. Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G: Cell Surface-bound Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Mediates Perforin-independent Apoptosis by Specific Binding and Uptake of Granzyme B. The Journal of biological chemistry, 278: 41173-41181(2003)

52. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries J E d, Roncarolo M G: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature (London), 389: 737-742(1997)

53. Hagn M, Ebel V, Sontheimer K, Schwesinger E, Lunov O, Beyer T, Fabricius D, Barth T F E, Viardot A, Stilgenbauer S, Hepp J, Scharffetter-Kochanek K, Simmet T, Jahrsdörfer B: CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. European Journal of Immunology, 40: 2060-2069(2010)

54. Hagn M, Jahrsdörfer B: Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. OncoImmunology, 1: 1368-1375(2012)

55. Hagn M, Schwesinger E, Ebel V, Sontheimer K, Maier J, Beyer T, Syrovets T, Laumonnier Y, Fabricius D, Simmet T, Jahrsdörfer B: Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 183: 1838-1845(2009)

56. Hagn M, Sontheimer K, Dahlke K, Brueggemann S, Kaltenmeier C, Beyer T, Hofmann S, Lunov O, Barth T F, Fabricius D, Tron K, Nienhaus G U, Simmet T, Schrezenmeier H, Jahrsdörfer B: Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. Immunology and cell biology, 90: 457-467(2012)

57. Hamming O J, Kang L, Svensson A, Karlsen J L, Rahbek-Nielsen H, Paludan S R, Hjorth S A, Bondensgaard K, Hartmann R: Crystal Structure of Interleukin-21 Receptor (IL-21R) Bound to IL-21 Reveals That Sugar Chain Interacting with WSXWS Motif Is Integral Part of IL-21R. The Journal of Biological Chemistry, 287: 9454-9460(2012)

58. Han Z T, Tong Y K, He L M, Zhang Y, Sun J Z, Wang T Y, Zhang H, Cui Y L, Newmark H L, Conney A H, Chang R L: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapeutic drugs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95:5362-5(1998)

59. Han Z T, Zhu X X, Yang R Y, Sun J Z, Tian G F, Liu X J, Cao G S, Newmark H L, Conney A H, Chang R L: Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95:5357-61(1998)

60. Hecker E, Schmidt R: Phorbolesters - the irritants and cocarcinogens of Croton Tiglium L. Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe, 31: 377-467(1974)

61. Heusel J W, Hanson R D, Silverman G A, Ley T J: Structure and expression of a cluster of human hematopoietic serine protease genes found on chromosome 14q11.2. The Journal of Biological Chemistry, 266: 6152-6158(1991)

62. Hirst C E, Buzza M S, Sutton V R, Trapani J A, Loveland K L, Bird P I: Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. Molecular human reproduction, 7: 1133-1142(2001)

63. Holm C, Nyvold C G, Paludan S R, Plaudan S R, Thomsen A R, Hokland M: Interleukin-21 mRNA expression during virus infections. Cytokine, 33: 41-45(2006)

64. Huang C, Bi E, Hu Y, Deng W, Tian Z, Dong C, Hu Y, Sun B: A novel NF-kappaB binding site controls human granzyme B gene transcription. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 176: 4173-4181(2006)

65. Berenblum I, Shubik P: A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin. British journal of cancer, 1:383-91(1947)

66. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly R P, Larner A C, Finbloom D S: Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. Blood, 93: 1456-1463(1999)

67. Itsumi M, Shiota M, Yokomizo A, Takeuchi A, Kashiwagi E, Dejima T, Inokuchi J, Tatsugami K, Uchiumi T, Naito S: PMA induces androgen receptor downregulation and cellular apoptosis in prostate cancer cells. Journal of molecular endocrinology, 53: 31-41(2014)

68. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo D J, Yanaba K, Venturi G M, Szabolcs P M, Bernstein S H, Magro C M, Williams A D, Hall R P, St Clair E W, Tedder T F: Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood, 117: 530-541(2011)

69. Jahrsdörfer B: Granzyme B produced by Plasmacytoid Dendritic Cells Promotes Antigen uptake While Suppressing Premature T cell Activation. International Journal of Vaccine Research, 1: 1-3(2016)

70. Jahrsdörfer B, Blackwell S E, Wooldridge J E, Huang J, Andreski M W, Jacobus L S, Taylor C M, Weiner G J: B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. Blood, 108: 2712-2719(2006)

71. Jahrsdörfer B, Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, Schütz C, Hönig M, Kirchhoff F, Schrezenmeier H: IL-21-Mediated Generation of Human Regulatory B Cells Occurs Independently of CD40 Signaling. Blood, 124: 1413-1413(2014)

72. Jahrsdörfer B, Vollmer A, Blackwell S E, Maier J, Sontheimer K, Beyer T, Mandel B, Lunov O, Tron K, Nienhaus G U, Simmet T, Debatin K, Weiner G J, Fabricius D: Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. Blood, 115: 1156-1165(2010)

73. Jenne D E, Tschopp J: Granzymes, a Family of Serine Proteases Released from Granules of Cytolytic T Lymphocytes upon T Cell Receptor Stimulation. Immunological Reviews, 103: 53-71(1988)

74. Jin H, Carrio R, Yu A, Malek T R: Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 173: 657-665(2004)

75. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder T F: IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. Arthritis research & therapy, 15 Suppl 1: S1(2013)

76. Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, Lindner S, Trzaska T, van der Merwe J A, Härter G, Grüner B, Fabricius D, Lotfi R, Schwarz K, Schütz C, Hönig M, Schulz A, Kern P, Bommer M, Schrezenmeier H, Kirchhoff F, Jahrsdörfer B: CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 194: 3768-3777(2015)

77. Kang L, Bondensgaard K, Li T, Hartmann R, Hjorth S A: Rational Design of Interleukin-21 Antagonist through Selective Elimination of the γC Binding Epitope. The Journal of Biological Chemistry, 285: 12223-12231(2010)

78. Knickelbein J E, Khanna K M, Yee M B, Baty C J, Kinchington P R, Hendricks R L: Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. Science (New York, N.Y.), 322: 268-271(2008)

79. Kotb A, Klippert A, Daskalaki M, Sauermann U, Stahl-Hennig C, Neumann B: Elevated granzyme B+ B-cell level in SIV-infection correlate with viral load and low CD4 T-cell count. Immunology and cell biology, 95: 316-320(2017)

80. Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Production of proinflammatory cytokines by phorbol myristate acetate-treated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 161: 6245-6249(1998)

81. Kurschus F C, Jenne D E: Delivery and therapeutic potential of human granzyme B. Immunological Reviews, 235: 159-171(2010)

82. Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, Rossille D, Tarte K, Fest T: IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 189: 161-173(2012)

83. Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O: IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. The Journal of allergy and clinical immunology, 123: 758-762(2009)

84. Lighaam L C, Unger P A, Vredevoogd D W, Verhoeven D, Vermeulen E, Turksma A W, ten Brinke A, Rispens T, van Ham S M: In vitro-Induced Human IL-10+ B Cells Do Not Show a Subset-Defining Marker Signature and Plastically Co-express IL-10 With Pro-Inflammatory Cytokines. Frontiers in immunology, 9: 1913 (2018)

85. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth T F E, Beyer T, Reister F, Fabricius D, Lotfi R, Lunov O, Nienhaus G U, Simmet T, Kreienberg R, Möller P, Schrezenmeier H, Jahrsdörfer B: Interleukin 21–Induced Granzyme B–Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. Cancer Research, 73: 2468-2479(2013)

86. Lobe C G, Finlay B B, Paranchych W, Paetkau V H, Bleackley R C: Novel serine proteases encoded by two cytotoxic T lymphocyte-specific genes. Science (New York, N.Y.), 232: 858-861(1986)

87. Lykken J M, Candando K M, Tedder T F: Regulatory B10 cell development and function. International immunology, 27: 471-477(2015)

88. Macho-Fernandez E, Brigl M: The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions. Frontiers in immunology, 6: 362(2015)

89. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, Owczuk R, Szadkowska A, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P: Therapy of type 1 diabetes with CD4+ CD25high CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — Results of one year follow-up. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 153: 23-30(2014)

90. Martin F, Kearney J F: B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. Current Opinion in Immunology, 13: 195-201(2001)

91. Matsushita T, Tedder T F: Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. Methods in molecular biology, 677: 99-111(2011)

92. Mauri C, Menon M: The expanding family of regulatory B cells. International immunology, 27: 479-486(2015)

93. Meducator T, Visva S, Oliveria J, Zheng R: Understanding regulatory B cell development with single cell analyses. Meducator, 1: 19-22(2019)

94. Mehta D S, Wurster A L, Grusby M J: Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. Immunological Reviews, 202: 84-95(2004)

95. Mehta D S, Wurster A L, Whitters M J, Young D A, Collins M, Grusby M J: IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 170: 4111-4118(2003)

96. Metkar S S, Wang B, Ebbs M L, Kim J H, Lee Y J, Raja S M, Froelich C J: Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. The Journal of cell biology, 160: 875-885(2003)

97. Mihalik R, Farkas G, Kopper L, Benczúr M, Faragó A: Possible involvement of protein kinase C-epsilon in phorbol ester-induced growth inhibition of human lymphoblastic cells. The international journal of biochemistry & cell biology, 28: 925-933(1996)

98. Mihalik R, Uher F, Peták I, Sebestyén A, Kopper L: Regulation of Differentiation, Proliferation and Drug-Induced Apoptosis in HT58 Lymphoma Cells. Pathology oncology research, 3: 100-105(1997)

99. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg R S, Bhan A K: Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. Immunity, 16: 219-230(2002)

100. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K: New perspectives in B-1 B cell development and function. Trends in immunology, 27: 428-433(2006)

101. Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual review of immunology, 19: 683-765(2001)

102. Moreau A, Blair P A, Chai J, Ratnasothy K, Stolarczyk E, Alhabbab R, Rackham C L, Jones P M, Smyth L, Elgueta R, Howard J K, Lechler R I, Lombardi G: Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. European Journal of Immunology, 45: 843-853(2015)

103. Mosior M, Newton A C: Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. The Journal of Biological Chemistry, 270: 25526-25533(1995)

104. Motyka B, Korbutt G, Pinkoski M J, Heibein J A, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes C F B, Gauldie J, Bleackley R C: Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell–Induced Apoptosis. Cell, 103: 491-500(2000)

105. Mulligan-Kehoe M J, Drinane M C, Mollmark J, Casciola-Rosen L, Hummers L K, Hall A, Rosen A, Wigley F M, Simons M: Antiangiogenic plasma activity in patients with systemic sclerosis. Arthritis and rheumatism, 56: 3448-3458(2007)

106. Muramatsu T: Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. Journal of biochemistry, 159: 481-490(2016)

107. Nelson B H: CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 185: 4977-4982(2010)

108. Neta R, Salvin S B: Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 113: 1716-1725(1974)

109. Odake S, Kam C M, Narasimhan L, Poe M, Blake J T, Krahenbuhl O, Tschopp J, Powers J C: Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. Biochemistry, 30: 2217-2227(1991)

110. Ohtsuka T, Kaziro Y, Satoh T: Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. Biochimica et biophysica acta, 1310: 223-232(1996)

111. Oleinika K, Rosser E C, Matei D E, Nistala K, Bosma A, Drozdov I, Mauri C: CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. Nature Communications, 9: 1-17(2018)

112. Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young P R, Leonard W J: Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 11439-11444(2000)

113. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim H, Wang G, Qi C, Hwu P, Shaffer D J, Akilesh S, Roopenian D C, Morse H C, Lipsky P E, Leonard W J: Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 173: 5361-5371(2004)

114. Papp G, Gyimesi E, Szabó K, Zöld É, Zeher M: Increased IL-21 Expression Induces Granzyme B in Peripheral CD5+ B Cells as a Potential Counter-Regulatory Effect in Primary Sjögren's Syndrome. Mediators of inflammation, 2016: 4328372(2016)

115. Parrish-Novak J, Dillon S R, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross J A, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt

C, Kuijper J L, Kramer J, Conklin D, Presnell S R, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant F J, Lofton-Day C, Gilbert T, Raymond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly R D, Foster D: Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature (London), 408: 57-63(2000)

116. Peters P J, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, Slot J W, Geuze H J: Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. The Journal of experimental medicine, 173: 1099-1109(1991)

117. Poe M, Blake J T, Boulton D A, Gammon M, Sigal N H, Wu J K, Zweerink H J: Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. Journal of Biological Chemistry, 266: 98-103(1991)

118. Rabani M, Wilde B, Hübbers K, Xu S, Kribben A, Witzke O, Dolff S: IL-21 dependent Granzyme B production of B-cells is decreased in patients with lupus nephritis. Clinical Immunology, 188: 45-51(2018)

119. Rech A J, Mick R, Martin S, Recio A, Aqui N A, Powell D J, Colligon T A, Trosko J A, Leinbach L I, Pletcher C H, Tweed C K, DeMichele A, Fox K R, Domchek S M, Riley J L, Vonderheide R H: CD25 Blockade Depletes and Selectively Reprograms Regulatory T Cells in Concert with Immunotherapy in Cancer Patients. Science translational medicine, 4: 134ra62(2012)

120. Reichl F, Högg C, Liu F, Schwarz M, Teupser D, Hickel R, Bloch W, Schweikl H, Thomas P, Summer B: Actovegin® reduces PMA-induced inflammation on human cells. European journal of applied physiology, 120: 1671-1680(2020)

121. Sheng J R, Quan S, Soliven B: IL-10 derived from CD1dhi CD5+ B cells regulates experimental autoimmune myasthenia gravis. Journal of Neuroimmunology, 289: 130-138(2015)

122. Shi L, Kam C M, Powers J C, Aebersold R, Greenberg A H: Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. The Journal of experimental medicine, 176: 1521-1529(1992)

123. Shlomchik M J, Madaio M P, Ni D, Trounstein M, Huszar D: The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. The Journal of experimental medicine, 180: 1295-1306(1994)

124. Sikkema, W.D: An FC-binding Protein. Armer Biotech Lab, 7: 42(1989)

125. Simon M M, Kramer M D, Prester M, Gay S: Mouse T-cell associated serine proteinase 1 degrades collagen type IV: a structural basis for the migration of lymphocytes through vascular basement membranes. Immunology, 73: 117-119(1991)

126. Slaga T J: SENCAR mouse skin tumorigenesis model versus other strains and stocks of mice. Environmental health perspectives, 68: 27-32(1986)

127. Smyth M J, McGuire M J, Thia K Y: Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 154: 6299-6305(1995)

128. Spaeny-Dekking E H, Hanna W L, Wolbink A M, Wever P C, Kummer J A, Kummer A J, Swaak A J, Middeldorp J M, Huisman H G, Froelich C J, Hack C E: Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 160: 3610-3616(1998)

129. Spolski R, Leonard W J: Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. Nature Reviews Drug Discovery, 13: 379-395(2014)

130. Spolski R, Leonard W J: IL-21 and T follicular helper cells. International Immunology, 22: 7-12(2010)

131. Spolski R, Leonard W J: Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. Annual Review of Immunology, 26: 57-79(2008)

132. Strair R K, Schaar D, Goodell L, Aisner J, Chin K, Eid J, Senzon R, Cui X X, Han Z T, Knox B, Rabson A B, Chang R, Conney A: Administration of a Phorbol Ester to Patients with Hematological Malignancies. Clinical cancer research, 8: 2512-2518(2002)

133. Strik M C M, de Koning P J A, Kleijmeer M J, Bladergroen B A, Wolbink A M, Griffith J M, Wouters D, Fukuoka Y, Schwartz L B, Hack C E, van Ham S M, Kummer J A: Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. Molecular Immunology, 44: 3462-3472(2007)

134. Sutton V R, Wowk M E, Cancilla M, Trapani J A: Caspase Activation by Granzyme B Is Indirect, and Caspase Autoprocessing Requires the Release of Proapoptotic Mitochondrial Factors. Immunity (Cambridge, Mass.), 18: 319-329(2003)

135. ten Berge I J, Wever P C, Wolbink A M, Surachno J, Wertheim P M, Spaeny L H, Hack C E: Increased systemic levels of soluble granzymes A and B during primary cytomegalovirus infection after renal transplantation. Transplantation Proceedings, 30: 3972-3974(1998)

136. Terabe M, Berzofsky J A: The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases. Cancer immunology, immunotherapy, 63: 199-213(2014)

137. Thornberry N A, Rano T A, Peterson E P, Rasper D M, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager V M, Nordstrom P A, Roy S, Vaillancourt J P, Chapman K T, Nicholson D W: A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B functional relationships established for key mediators of apoptosis. Journal of Biological Chemistry, 272: 17907-17911(1997)

138. Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitsu M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Bashuda H, Habu S, Demetris A J, Okumura K: A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. Hepatology, 64: 632-643(2016)

139. Trapani J A, Sutton V R: Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. Current opinion in immunology, 15: 533-543(2003)

140. Tschopp C M, Spiegl N, Didichenko S, Lutmann W, Julius P, Virchow J C, Hack C E, Dahinden C A: Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. Blood, 108: 2290-2299(2006)

141. Turk J L, Parker D, Katz S I: B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. Nature, 251: 550-551(1974)

142. van Kooten C, Banchereau J: CD40-CD40 ligand. Journal of Leukocyte Biology, 67: 2-17(2000)

143. Veh J, Mangold C, Felsen A, Ludwig C, Gerstner L, Reinhardt P, Schrezenmeier H, Fabricius D, Jahrsdörfer B: Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B+ regulatory phenotype. Frontiers in Immunology,14: 1194880(2023)

144. Velotti F, Barchetta I, Cimini F A, Cavallo M G: Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. Frontiers in Immunology, 11: 587581(2020)

145. Veugelers K, Motyka B, Goping I S, Shostak I, Sawchuk T, Bleackley R C: Granule-mediated Killing by Granzyme B and Perforin Requires a Mannose 6-Phosphate Receptor and Is Augmented by Cell Surface Heparan Sulfate. Molecular Biology of the Cell, 17: 623-633(2006)

146. Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard W J, Hwu P: In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. Cancer Research, 63: 9016-9022(2003)

147. Wang P, Wu P, Siegel M I, Egan R W, Billah M M: Interleukin (IL)-10 Inhibits Nuclear Factor B (NFB) Activation in Human Monocytes IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. Journal of Biological Chemistry, 270: 9558-9563(1995)

148. Wieckowski E, Wang G, Gastman B R, Goldstein L A, Rabinowich H: Granzyme B-mediated degradation of T-cell receptor zeta chain. Cancer Research, 62: 4884-4889(2002)

149. Willems F, Marchant A, Delville J P, Gérard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M: Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. European Journal of Immunology, 24: 1007-1009(1994)

150. Wolf S D, Dittel B N, Hardardottir F, Janeway C A: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell–deficient Mice. Journal of Experimental Medicine, 184: 2271-2278(1996)

151. Wowk M E, Trapani J A: Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. Microbes and Infection, 6: 752-758(2004)

152. Xu L, Liu X, Liu H, Zhu L, Zhu H, Zhang J, Ren L, Wang P, Hu F, Su Y: Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis. Frontiers in immunology, 8: 768(2017)

153. Xu W, Narayanan P, Kang N, Clayton S, Ohne Y, Shi P, Herve M, Balderas R, Picard C, Casanova J, Gorvel J, Oh S, Pascual V, Banchereau J: Human plasma cells express granzyme B. European Journal of Immunology, 44: 275-284(2014)

154. Yamaguchi R, Kawata J, Yamamoto T, Ishimaru Y, Sakamoto A, Ono T, Narahara S, Sugiuchi H, Hirose E, Yamaguchi Y: Mechanism of interferon-gamma production by monocytes stimulated with myeloperoxidase and neutrophil extracellular traps. Blood Cells, Molecules and Diseases, 55: 127-133(2015)

155. Yanaba K, Bouaziz J, Haas K M, Poe J C, Fujimoto M, Tedder T F: Article: A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dCD5 Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. Immunity (Cambridge, Mass.), 28: 639-650(2008)

156. Yang M, Deng J, Liu Y, Ko K, Wang X, Jiao Z, Wang S, Hua Z, Sun L, Srivastava G, Lau C, Cao X, Lu L: IL-10–Producing Regulatory B10 Cells Ameliorate Collagen-Induced Arthritis via Suppressing Th17 Cell Generation. The American journal of pathology, 180: 2375-2385(2012)

157. Yang W, Li Y, Li P, Wang L: PMA/IONO affects diffuse large B-cell lymphoma cell growth through upregulation of A20 expression. Oncology Reports, 36: 1069-1075(2016)

158. Yang X, Stennicke H R, Wang B, Green D R, Jänicke R U, Srinivasan A, Seth P, Salvesen G S, Froelich C J: Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. The Journal of Biological Chemistry, 273: 34278-34283(1998)

159. Yao H, Teng Y, Sun Q, Xu J, Chen Y, Hou N, Cheng X, Yang X, Chen Z: Important functional roles of basigin in thymocyte development and T cell activation. International Journal of Biological Sciences, 10: 43-52(2013)

160. Zeller J C, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy W J, Ruscetti F W, Narula S, Roncarolo M G, Blazar B R: Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 163: 3684-3691(1999)

161. Zha B, Wang L, Liu X, Liu J, Chen Z, Xu J, Sheng L, Li Y, Chu Y: Decrease in proportion of CD19+ CD24(hi) CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease. PloS one, 7: e49835(2012)

162. Zhang D, Beresford P J, Greenberg A H, Lieberman J: Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 5746-5751(2001)

163. Zheng X, Chang R L, Cui X X, Kelly K A, Shih W J, Lin Y, Strair R, Suh J, Han Z T, Rabson A, Conney A H: Synergistic effects of clinically achievable concentrations of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in combination with all-trans retinoic acid, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3, and sodium butyrate on differentiation in HL-60 cells. Oncology Research, 12: 419-427(2000)

164. Zhou H, Zhan F, Zhang H, Gu J, Mu X, Gao J, Rao J, Ji G, Ni X, Lu L, Xia Y: The proportion of CD19(+)CD24(hi)CD27(+) regulatory B cells predicts the occurrence of acute allograft rejection in liver transplantation. Annals of translational medicine, 7: 465 (2019)

165. Zhu G, Chen Y, Zhang X, Wu Q, Zhao Y, Sun F, Qiao Y, Wang J: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) is anti-tumorigenic in liver cancer cells via inhibiting YAP through AMOT. Scientific reports, 7: 44940(2017)

166. Zhu J, Zeng Y, Dolff S, Bienholz A, Lindemann M, Brinkhoff A, Schedlowski M, Xu S, Sun M, Guberina H, Kirchhof J, Kribben A, Witzke O, Wilde B: Clinical immunology. Clinical immunology, 184: 48-53(1999)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 | B-Zell-Differenzierung in Abhängigkeit von der CD40-Ligation 6
Abbildung 2 | Therapeutisches Potential Granzym B-exprimierender regulatorischer B-Zellen (GraB cells) zur Behandlung hyperinflammatorischer Erkrankungen 10
Abbildung 3 | Analogie zwischen Diacylglycerol (DAG) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) 12
Abbildung 4 | Signalgebung des B-Zell-Rezeptors (BCR) 13
Abbildung 5 | Ermittlung der Viabilität mittels Flow Jo 30
Abbildung 6 | Ermittlung der Reinheit mittels Flow Jo 30
Abbildung 7 | Definition Granzym B (GrB)-exprimierender B-Zellen 31
Abbildung 8 | Gegenüberstellung der Apoptoserate von Spontanlyse, Maximallyse und Spezifischer Lyse 32
Abbildung 9 | Gating Strategie im PanToxiLux-Assay 35
Abbildung 10 | Gegenüberstellung von Spontanlyse, Spezifischer Lyse und Maximallyse im Europium-Release-Assay 36
Abbildung 11 | Zunahme des Granzym B (GrB)-positiven Anteils in Abhängigkeit von Interleukin 21 40
Abbildung 12 | B-Zell-Stimulation mit Interleukin 21 40
Abbildung 13 | Isolierte B-Zell-Stimulation mit anti-BCR gegenüber Interleukin 21 41
Abbildung 14 | B21-Stimulation unterschiedlicher Dosierung 42
Abbildung 15 | Granzym B-Parameter unter B21-Stimulation 43
Abbildung 16 | Induktion von GraB cells via Protein A 45
Abbildung 17 | Einflussnahme von Protein A und Protein A/G auf den Anteil an GraB cells 45
Abbildung 18 | Protein A-Stimulation mit additiver Zugabe von Gamunex oder anti-BCR 46
Abbildung 19 | Stimulation mit Protein G 47
Abbildung 20 | Positive Modulation der Granzym B-Parameter durch Protein A/G 49
Abbildung 21 | B-Zell-Stimulation mit GRP-78, LPS und Ionomycin 51
Abbildung 22 | Einfluss von MPLA und PHA auf die GrB-Induktion 52

Abbildung 23 | Morphologische Darstellung des Einflusses von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat auf die Expression von Granzym B 53
Abbildung 24 | Ausmaß der Induktion von Granzym B exprimierenden regulatorischen B-Zellen in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Stimulation 54
Abbildung 25 | Gegenüberstellung der P21-Stimulation mit B21 55
Abbildung 26 | Granzym B-Induktion in B-Zellen bei aufsteigenden Konzentrationen an Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Interleukin 21 (IL-21) 56
Abbildung 27 | Parallele Stimulation von B-Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und weiteren Stimulanzien 58
Abbildung 28 | Stimulation von B-Zellen mit P21 und Gamunex oder NEMO binding peptide (NBP) 59
Abbildung 29 | Inhibierender Einfluss von CD40-Ligand auf die Induktion von GraB cells durch P21 60
Abbildung 30 | Viabilität der B-Zellen anhand morphologischer Kriterien 61
Abbildung 31 | Morphologische Darstellung der Viabilität von B-Zellen in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Stimulation 62
Abbildung 32 | Oberflächenmarker in Abhängigkeit von anti-BCR, Protein A/G und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) 64
Abbildung 33 | Oberflächenmarker auf B-Zellen in Abhängigkeit von anti-BCR und Protein A/G 65
Abbildung 34 | Oberflächenmarkerexpression auf $CD19^+$ B-Zellen innerhalb von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) in Abhängigkeit von anti-BCR und Protein A/G 66
Abbildung 35 | Anteil apoptotischer Targetzellen in Abhängigkeit vom Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen 68
Abbildung 36 | Nachweis spezifischer Lyse im PanToxiLux-Assay 68
Abbildung 37 | Einfluss von GraB cells auf die T-Zell-vermittelte Lyse allogener peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 | Laborausstattung: Geräte 15
Tabelle 2 | Zellmaterial: Blutprodukte 16
Tabelle 3 | Verbrauchsmaterial 17
Tabelle 4 | Kommerzielle Puffer 18
Tabelle 5 | Angesetzte Puffer 19
Tabelle 6 | Medien 19
Tabelle 7 | Chemikalien 20
Tabelle 8 | Reagenzien und Stimulanzien 20
Tabelle 9 | KITS 22
Tabelle 10 | Antikörper und Fluorochrome 22
Tabelle 11 | Software 24
Tabelle 12 | B-Zell-Isolationen aus Leukapheresaten IX
Tabelle 13 | B-Zell-Isolationen aus peripherem Vollblut X
Tabelle 14 | Isolation von Peripheren mononukleären Blutzellen aus peripherem Vollblut X
Tabelle 15 | Isolation von T-Zellen X

Anhang

Tabelle 12 | B-Zell-Isolationen aus Leukapheresaten

Versuch	WBC [10^3/µl]	Größe Apheresat [%]	Zahl isolierter PBMC [*10^6]	Zahl isolierter BC [*10^6]	Anteil isolierter BC an PBMC berechnet [%]	Anteil isolierter BC an PBMC [%] (FACS)	Viabilität [%]	Reinheit [%]
6	26,44	100	800	23,8	2,98	7,29	96,1	98,3
7	19,79	100	680	21,6	3,18	5,16	88	98,8
8	73,08	20	1500	29,125	1,94	13,1	98,9	99,7
9	54,42	20	1500	36	2,4	17,6	95,9	98,4
10	N/A	N/A	348	23,1	6,64	13,1	94,4	99,2
11	23,2	100	875	16,72	1,91	7,76	93,6	99,3
12	56,74	100	653	13,75	2,11	12,6	97	97,1
16	23,93	100	820	17,92	2,19	6,9	92,5	97
21	19,57	100	910	5,2	0,57	1,97	95,7	98,8
25	43,24	100	1024	31,78	3,1	7,4	94,8	99,4
26	44,36	100	591	10,2	1,73	7,81	93,6	98,6
28	55,4	20	520	12,9	2,48	6,85	95,2	99,1
29	22,38	100	600	17,25	2,88	5,95	96,4	99,4
31	14,53	100	304	3,3	1,09	3,23	95,7	97,4
33	37,53	100	473	15,96	3,37	9,13	94,9	99,1
38	20,3	100	912	44,37	4,87	9,96	96,1	98,4
40	19,64	100	769	26,3	3,42	9,26	98,6	98
43	20,01	100	615	14,375	2,34	9,95	89,5	98,5
53	44,36	100	652	17,6	2,7	N/A	90,5	95,6
55	40,84	20	1000	96	9,6	11,9	96,2	98,2
58	49,7	20	800	47,4	5,93	9,61	96,4	96,7
59	49,7	20	800	47,4	5,93	9,61	96,4	96,7
66.3	35,77	100	900	38,55	4,28	N/A	87,3	95
Mittelwert	**36,13**		**785**	**26,5**	**3,37**	**8,86**	**94,51**	**98,12**
SEM	**3,44**		**62,95**	**4,20**	**0,43**	**0,8**	**0,65**	**0,27**

Tabelle 13 | B-Zell-Isolationen aus peripherem Vollblut

Versuch	Anzahl isolierter PBMC [*10^6]	Anzahl isolierter BC [*10^6]	Anteil isolierter BC an PBMC [%]	Anteil isolierter BC an PBMC [%] (FACS)	Viabilität [%]	Reinheit [%]
5	120	4	3,33	3,44	93,6	98,3
39	186	10	5,38	7,21	97,7	98,3
44	190	7	3,68	9,66	94,3	95,7
45	138	9,3	6,74	N/A	83,6	99,6
50	185,5	10,08	5,43	N/A	50	99,8
51	236	9	3,81	6,39	94,8	97,1
54	375	9	2,40	5,53	96,1	97
57	147	9	6,12	9,91	97,8	97,7
60	150	5,3	3,53	N/A	70,7	99,5
62	236,32	19,09	8,08	11	97,9	99,2
63	190,9	14,5	7,60	9,89	97,4	99,5
64	214,6	4	1,86	6,27	96,4	98,1
68	180	13,25	7,36	N/A	91,6	90,7
69	170,5	16,9	9,91	N/A	78,7	99,4
71	190	6,26	3,29	8,88	84,6	98,7
Mittelwert	193,99	9,78	5,24	7,82	88,35	97,91
SEM	15,50	1,16	0,61	0,76	3,45	0,60

Tabelle 14 | Isolation von Peripheren mononukleären Blutzellen aus peripherem Vollblut

Versuch	Material	Volumen (ml)	Anzahl isolierter PBMC [*10^6]
13	Vollblut	50	51,5
14	Vollblut	110	121,5
17	Vollblut	85	86,75
19	Vollblut	130	141
49	Vollblut	25	48
32	Vollblut	120	64
36.2	Vollblut	30	30,13
67	Vollblut	20	17
Mittelwert			69,98
SEM			15,37

Tabelle 15 | Isolation von T-Zellen

Versuch	Material	WBC [10^3/µl]	Anzahl isolierter PBMC [*10^6]	Anzahl isolierter T-Zellen [*10^6]	Anteil isolierter TC an PBMC [%]	Anteil isolierter TC an PBMC [%]	Reinheit [%] TCs	Viabilität [%]
32	Vollblut		165	69,1	41,88	75,3	97,7	98,9
32.2	Vollblut		59	37,35	63,31	N/A	99,4	98,2
34	Apheresat	41,91	80	43,03	53,79	N/A	99,6	94
36	Vollblut		75,5	64,25	85,10	83,6	98,1	91,2
66	Apheresat	35,77	35,5	8,8	24,79	38,55	96,8	97,5
Mittelwert		38,84	83,00	44,51	53,77	65,82	98,32	95,96
SEM		3,07	21,93	10,78	10,13	13,84	0,53	1,46

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.