

# **Vergleich der Kinetik der In-vitro-Stimulation von B-Gedächtniszellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Dr. med. dent. Sebastian Köppert**

aus Hamm

2026

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2026

Aus dem Institut für Neuroanatomie

In Erinnerung an meine geliebten Großeltern  
Hannelore und Horst



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	8
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	11
1.1	Das Immunsystem	11
1.2	Angeborenes Immunsystem	11
1.3	Erworbenes Immunsystem	12
1.3.1	T <sub>FH</sub> -Zellen	13
1.3.2	B-Lymphozyten	14
1.3.3	Sekundäre Immunantwort	18
1.4	<i>In-vitro</i> -Stimulation	20
1.5	ELISPOT-/FluoroSpot-Assay	21
1.6	COVID-19	23
1.7	Multiple Sklerose	24
1.8	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	26
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	28
2.1	Material	28
2.1.1	PBMC	28
2.1.2	<i>Coating</i> -Antikörper	29
2.1.3	Detektionsantikörper	29
2.1.4	Antigene	31
2.1.5	Puffer und Lösungen	31
2.1.6	Weitere Substanzen	33
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.8	Technische Geräte	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	<i>In-vitro</i> -Stimulation	37
2.2.1.1	Herstellung des Stimulationsmediums	37
2.2.1.2	Ansetzen der Zellkultur	38
2.2.2	FluoroSpot-Assay	39
2.2.2.1	<i>Coating</i> der Mikrotiterplatten	39

2.2.2.1.1	Antigenspezifische Mikrotiterplatten	39
2.2.2.1.2	Pan-IgM/G/G1/G2/G3/G4/A/E-Mikrotiterplatten	41
2.2.2.2	Durchführung des Assays	42
2.2.3	ELISA	44
2.2.3.1	Antigenspezifischer ELISA	44
2.2.3.1.1	<i>Coating</i> der Platten	44
2.2.3.1.2	Durchführung des Assays	46
2.2.3.2	Pan-IgG/E-ELISA	46
2.2.3.2.1	<i>Coating</i> der Platten	46
2.2.3.2.2	Durchführung des Assays	47
2.4	Statistik	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	49
3.1	<i>In-vitro</i> -Stimulation	49
3.2	Immunglobulinsekretion	51
3.2.1	IgM	51
3.2.2	IgG	53
3.2.3	IgG-Subklassen	56
3.2.4	IgA	59
3.2.5	IgE	61
3.2.6	Antigenreaktive IgG <sup>+</sup> -sezernierende ASZ	63
3.3	COVID-19	68
3.3.1	Detektion von IgM/G/A/E <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ nach COVID-19-Impfung ohne ( <i>ex vivo</i> ) und mit <i>In-vitro</i> -Stimulation	68
3.3.2	Detektion antigenreaktiver IgG <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ nach COVID-19-Impfung oder Genesung	72
3.4	Multiple Sklerose	74
3.4.1	Detektion antigenreaktiver IgG <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ bei MS-Patienten	74
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	76
4.1	<i>In-vitro</i> -Stimulation	76
4.1.1	Vergleich der beiden Stimulationsansätze	77
4.1.2	Immunglobulinsekretion	78
4.1.3	Die besondere Bedeutung von IgE	81

4.1.4	Antigenreaktive IgG <sup>+</sup> -sezernierende ASZ	82
4.2	Klinische Anwendung	84
4.2.1	FluoroSpot zur Evaluation von Impfungen gegen COVID-19	84
4.2.2	Multiple Sklerose	87
4.4	FluoroSpot versus ELISA	88
4.5	Limitationen und Ausblick	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>112</b>
<b>10.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>113</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>114</b>
<b>12.</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
~	ungefähr
>	größer
<	kleiner
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
σ	Standardabweichung
ANOVA	Varianzanalyse
ASZ	Antikörper-sezernierende Zelle
BCM	B-Zell-Medium
BIOT	Biotin
C	konstant
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	<i>Cluster of differentiation 40 Ligand</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CSR	Immunglobulinklassenwechsel
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunospot assay</i>
Fc	Fragment crystallizable
GlialCAM	<i>Hepatic and glial cell adhesion molecule</i>
HA	Hämagglutinin
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom

LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
M	Mol pro Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLC1	<i>Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1</i>
mM	Millimol pro Liter
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
ng	Nanogramm
ns	nicht signifikant
NCAP	Nucleocapsid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
p	Signifikanzwert
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
pH	Maßzahl für die Wasserstoffionenkonzentration (lat. <i>potentia hydrogenii</i> )
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
r	rekombinant
R848	Resiquimod (TLR-7/8-Agonist)
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
S	<i>Spike</i>

SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SFU	<i>Spot forming units</i>
SHM	Somatische Hypermutation
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
T <sub>FH</sub> -Zellen	Follikuläre T-Helferzelle
T <sub>H1</sub> -Zellen	T-Helferzelle Typ1
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Einheiten pro Milliliter
UNLB	<i>Unlabeled</i>
$\bar{x}$	Arithmetischer Mittelwert
Zellen/ml	Zellen pro Milliliter
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Um den menschlichen Organismus vor äußeren Bedrohungen, wie Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten oder anderen, potenziell schädlichen Einflüssen – wie autoreaktiven oder maligne transformierten, körpereigenen Zellen – zu schützen, hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem entwickelt. Um die Unberührtheit des Organismus aufrecht zu erhalten, hat der menschliche Körper zunächst chemische und anatomische Barrieren, wie (Schleim-) Häute, Zilien und Mukus zur Abgrenzung gegenüber der potenziell pathogenen Umwelt etabliert. Zu den chemischen Barrieren gehören neben dem niedrigen pH-Wert im Magen auch die in den Körpersekreten enthaltenen antimikrobiellen Enzyme und Peptide, wie Lysozyme und Defensine, die Erreger durch Lyse der Zellmembran angreifen und abtöten können (Murphy und Weaver, 2018).

Falls Pathogene diese initialen Barrieren überwinden, übernehmen die einzelnen Bestandteile des Immunsystems die Verteidigung des Körpers. Hierbei ist die Erkennung der potenziell schädlichen Organismen und die zielgerichtete, spezifische Elimination dieser von überaus wichtiger Bedeutung, um eine gleichzeitige kollaterale Zerstörung der körpereigenen Gewebe weitestgehend zu minimieren. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden setzt sich das menschliche Immunsystem aus unterschiedlichen zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen, welche sich klassisch zwei Systemen, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, zuordnen lassen.

## 1.2 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene oder auch unspezifische Immunsystem ist bereits bei der Geburt vorhanden und besteht aus verschiedenen Proteinen und zellulären Bestandteilen. Zu diesen zählen neben den Proteinen des Komplementsystems, die Krankheitserreger über die kaskadenartige Bildung des Membran-Angriff-Komplexes abtöten, die Akute-Phase-Proteine, Granulozyten, Mastzellen, das mononukleäre Phagozytensystem, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und antigenpräsentierende Zellen, wie die dendritischen Zellen (Parkin und Cohen, 2001).

Die genannten zellulären Bestandteile erkennen anhand bestimmter molekularer Muster pathogene Organismen und können diese direkt bekämpfen oder der Phagozytose

zuführen. Diese sogenannten Pathogen-assoziierte molekulare Muster sind bestimmte, für die Organismen überlebenswichtige Strukturen, die eine Vielzahl pathogener Organismen miteinander teilen und welche über evolutionär konservierte *Pattern recognition receptors* der Immunzellen erkannt werden (Medzhitov und Janeway, 1997). In ihrem Übersichtsartikel zählen *Akira et al.* (2006) zu diesen *Pattern recognition receptors* auch die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), welche auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert werden. Zu diesen Zellen gehören neben Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen auch die B-Lymphozyten, die jedoch der adaptiven Immunantwort zugeordnet werden (Akira et al., 2006). Die TLR sind Membranrezeptoren, welche unterschiedliche, mit Pathogenen assoziierte Strukturen, wie virale doppelsträngige Ribonukleinsäuren (RNA) (TLR-3), virale einzelsträngige RNA (TLR-7/8) oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (TLR-4) erkennen können (Akira et al., 2006). Bei Aktivierung der Rezeptoren durch einen passenden Liganden kommt es über intrazelluläre Signalkaskaden zur Initiierung einer Immunantwort (Akira et al., 2006).

### 1.3 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene oder auch adaptive Immunsystem setzt sich aus Lymphozyten zusammen, die sich in T- und B-Lymphozyten unterteilen lassen und denen unterschiedliche Aufgaben für die Ausbildung einer erregerspezifischen Immunreaktion zukommen. Beide Zelllinien leiten sich von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab (Murphy und Weaver, 2018), jedoch findet die weitere Differenzierung an zwei getrennten Orten statt. So wandern die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten (T-Zellen) in einem frühen Stadium aus dem Knochenmark in den Thymus aus, um dort weitere Differenzierungsschritte zu durchlaufen (Kumar et al., 2018). Anhand der exprimierten Corezeptoren, die zusätzlich zum T-Zell-Rezeptor (TZR) zur Erkennung und Bindung eines Antigens beitragen, unterscheidet man zwischen *Cluster of differentiation* (CD) 4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten.

Die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten können als zytotoxische T-Zellen mit ihrem TZR Peptide erkennen, die durch gesunde, aber auch z. B. viral infizierte Zellen, synthetisiert und ihnen über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-I-Moleküle durch ebendiese präsentiert werden (Parkin und Cohen, 2001). Wichtig ist hierbei, dass die MHC-I-Moleküle – im Gegensatz zu den MHC-II-Molekülen – auf fast allen somatischen Zellen – mit Ausnahme

der Erythrozyten – exprimiert werden. Somit findet eine ständige Präsentation unterschiedlicher, endogen synthetisierter Proteine durch körpereigene Zellen und eine gleichzeitige Abtastung durch die T-Zellen statt. Wird ein präsentiertes Peptid durch den TZR der  $CD8^+$  T-Lymphozyten gebunden und als körperfremd erkannt, führt dies zur Aktivierung der zytotoxischen T-Zelle, die mit der Freisetzung von Perforin und der Einschleusung ihrer lytischen Enzyme in die Zielzelle reagiert (Nicholson, 2016; Parkin und Cohen, 2001).

Die Antigenerkennung durch  $CD4^+$  T-Lymphozyten – den T-Helferzellen – erfolgt nach dem gleichen Schema, doch tasten diese mit ihrem TZR antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten (B-Zellen) ab, welche ihnen über ihre MHC-II-Moleküle in den Endosomen prozessierte, exogene Antigenfragmente präsentieren (Parkin und Cohen, 2001). Folglich werden diesen Lymphozyten stetig wechselnde Peptidfragmente des umgebenden Gewebes und – im Gegensatz zu den  $CD8^+$  T-Zellen – keine durch die Zellen selbst synthetisierte Proteine präsentiert.

Im Kontext von viralen und intrazellulären Erregern sind die T-Helferzellen Typ 1 ( $T_{H1}$ -Helferzellen), eine Subpopulation der  $CD4^+$  T-Lymphozyten, von besonderer Wichtigkeit. Diese entwickeln sich aus naiven T-Lymphozyten und sekretieren bei ihrer Aktivierung Effektormoleküle wie Interferon-*Gamma*, welches wiederum über die Aktivierung von Makrophagen die Phagozytose der infizierten Zelle bewirkt (Geginat et al., 2013; Szabo et al., 2000). Über die Expression von *Fas*-Liganden und CD40-Ligand (CD40L) ist auch eine direkte, pro-apoptotische Interaktion der  $T_{H1}$ -Helferzelle mit der infizierten Zelle möglich (Kotov et al., 2018).

### 1.3.1 $T_{FH}$ -Zellen

Neben den  $T_{H1}$ -Helferzellen sind weitere Subpopulationen der  $CD4^+$  T-Zellen bekannt, von denen die  $T_{FH}$ -Zellen für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, da sie für die T-Zell-abhängige Differenzierung der B-Zellen in den Lymphfollikeln verantwortlich sind (siehe 1.3.2 B-Lymphozyten). Die  $T_{FH}$ -Zellen exprimieren bei ihrer Aktivierung CXCR5-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5, ein Oberflächenrezeptor, der es ihnen ermöglicht, die von den aktivierten B-Zellen in sekundären lymphatischen Organen gebildeten Lymphfollikel zu lokalisieren, an die Grenze zwischen T- und B-Zell-Zone zu wandern und so mit den B-Lymphozyten zu interagieren (Breitfeld et al., 2000; Chtanova et al., 2004; Moens und

Tangye, 2014). Dies ermöglicht die Ansammlung von T<sub>FH</sub>-Zellen an der Grenze der B-Zell-Zone, die von demselben Antigen aktiviert wurden, das auch den B-Lymphozyten in den Lymphfollikeln präsentiert wurde, sodass sich die Wahrscheinlichkeit des für die Ausprägung einer humoralen Immunantwort notwendigen Aufeinandertreffens von B- und T-Lymphozyten gleicher Antigenspezifität stark erhöht. Zusätzlich werden weitere Oberflächenrezeptoren wie CD40L ausgebildet, aber auch Zytokine wie Interleukin (IL)-4, IL-10 und IL-21 sezerniert (Übersichtsartikel (Moens und Tangye, 2014; Weinstein et al., 2016)), welche die Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten beeinflussen.

### 1.3.2 B-Lymphozyten

Die zweite große Zellgruppe des adaptiven Immunsystems sind die B-Lymphozyten, welche durch die Sekretion der von ihnen synthetisierten Immunglobuline (Ig) für eine effiziente Opsonierung und Neutralisierung der als pathogen erkannten Strukturen sorgen. Bevor die B-Zellen gegen Ende ihrer Reifung aus dem Knochenmark auswandern, durchlaufen sie ebendort den Großteil ihres Reifungsprozesses bis zur Ausschwemmung als unreife B-Lymphozyten. Hierbei entwickelt sich aus der hämatopoetischen Stammzelle die Pro-B-Zelle, in welcher es zur Umlagerung der Segmente auf den schweren und leichten Ketten kommt (Pieper et al., 2013). Dieser als somatische Rekombination bezeichnete Prozess ist maßgeblich verantwortlich für das enorm vielfältige Repertoire von mehr als  $5 \times 10^{13}$  verschiedenen Antigenspezifitäten (Pieper et al., 2013). Anschließend erfolgt der Übergang ins Stadium der unreifen B-Zelle. Diese exprimiert auf ihrer Oberfläche IgM-Moleküle, anhand derer die B-Zellen – im Rahmen der Ausbildung einer zentralen Toleranz – auf Autoreaktivität getestet werden (Murphy und Weaver, 2018; Pieper et al., 2013).

Nach der Ausschwemmung der unreifen B-Lymphozyten aus dem Knochenmark erfolgt eine erneute Testung in der weißen Pulpa der Milz und die abschließende Reifung zum naiven B-Lymphozyt. Durch die anatomische Lage der Milz im Blutkreislauf kann den unreifen B-Lymphozyten dort eine weitaus größere Vielfalt an körpereigenen Proteinen präsentiert werden. Dieser Mechanismus wird analog als periphere Toleranz bezeichnet (Murphy und Weaver, 2018).

Nur wenige der ausgereiften B-Lymphozyten zirkulieren im Blut, während der Großteil in den sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten, den Peyer-Plaques und

der Milz verweilt. Kommt es zu einer Infektion, so werden Teile der pathogenen Organismen durch Makrophagen, dendritische Zellen und andere antigenpräsentierende Zellen – oder als frei in der Lymphe vorliegende Moleküle – in die sekundären lymphatischen Organe transportiert, um dort den naiven B-Zellen präsentiert werden zu können (Parkin und Cohen, 2001). Grundsätzlich lassen sich die möglichen Antigene und die damit ausgelösten B-Zell-Reaktionen in T-Zell-abhängige und -unabhängige unterteilen, wobei es sich bei den Antigenen, die eine Antikörpersekretion der B-Lymphozyten ohne T-Zell-Hilfe auslösen können, fast ausschließlich um quervernetzende, repetitive Strukturen wie LPS bakterieller Zellwände handelt (Chaplin, 2010). Da in der folgenden Studie als Antigene überwiegend rekombinante virale Protein verwendet wurden, wird beispielhaft die T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Lymphozyten dargestellt.

Bindet der B-Zell-Rezeptor ein präsentiertes oder frei vorliegendes Antigen so kommt es zur Aktivierung der B-Zelle, die zur Internalisierung und intrazellulären Prozessierung des Antigens führt. Gleichzeitig erfolgt die Expression von CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7 auf der Oberfläche der aktivierten B-Zelle, der die Wanderung der aktivierten B-Zelle an den Rand des Primärfollikels – der die Grenze zwischen B- und T-Zell-Zone darstellt – auslöst, damit diese dort mit den  $T_{FH}$ -Zellen in Kontakt treten kann (Reif et al., 2002). Ebendort werden die prozessierten Peptidfragmente des Pathogens über den MHC-II-Komplex auf der Oberfläche der aktivierten B-Zelle den  $T_{FH}$ -Zellen präsentiert, die bei Erkennung des präsentierten Fragmentes durch den TZR über ihre oberflächlichen Rezeptoren und die Ausschüttung von Zytokinen mit den B-Lymphozyten in Interaktion treten und diese so zur Proliferation und Differenzierung anregen (Murphy und Weaver, 2018). Hierbei unterscheidet man zwischen B-Lymphozyten, die daraufhin in die äußeren Follikelregionen wandern und solchen, die in die Primärfollikel eintreten. Die in die Peripherie der Follikel ausgewanderten B-Zellen bilden den Primärfokus und differenzieren sich über das Stadium des Plasmablasten zu Plasmazellen, welche durch ihr sezerniertes, niedrigaffines IgM einen initialen Schutz gewährleisten (Moens und Tangye, 2014). In den Primärfollikeln dagegen kommt es zur weiteren Differenzierung der B-Zellen zu kurz- bzw. langlebigen Plasmazellen und B-Gedächtniszellen. Dabei bilden sich Keimzentren aus, die den Übergang des Primärfollikels in das Stadium des Sekundärfollikels kennzeichnen, in denen weitere Differenzierungsschritte in Form einer Keimzentrumsreaktion durchlaufen werden. Hierzu zählt die somatische Hypermutation (SHM), bei der

durch die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase Punktmutationen in die variablen Regionen der Immunglobulingene eingeführt werden (Pieper et al., 2013). Dabei kommt es über die folgenden Zellgenerationen zu einer Anhäufung einzelner Mutationen. Diese bestimmen anschließend die weitere Differenzierung der Tochterzellen, da beim darauffolgenden Selektionsprozess nur die B-Zellen zur weiteren Differenzierung zugelassen werden, die eine erhöhte Affinität für das Antigen aufweisen, da nur diese erfolgreich mit den follikulären dendritischen Zellen und den  $T_{FH}$ -Lymphozyten interagieren können (Murphy und Weaver, 2018). Folglich stammt der Großteil der im Keimzentrum enthaltenen B-Lymphozyten nur von den wenigen B-Zellen ab, die diese Selektionsprozesse überlebt haben. Dieses Phänomen bezeichnet man als klonale Expansion (Murphy und Weaver, 2018).

Gleichzeitig kommt es im Sekundärfollikel zum Immunglobulinklassenwechsel (CSR) der B-Zellen, der durch alternatives Spleißen zur Rekombination von unveränderten Genen für die antigenspezifischen leichten Ketten mit unterschiedlichen konstanten (C)-Regionen führt, welche die genetischen Informationen für schweren Ketten codieren (Stavnezer, 1996). Ausgelöst durch IL-4 und CD40L kommt es zur Transkription der aktivierungsinduzierten Cytidin-Desaminase, welche wiederum während des Spleißvorganges das Herausschneiden der unterschiedlichen C-Regionen initiiert, sodass nur die Immunglobulinklasse synthetisiert wird, deren codierende C-Region nicht herausgespleißt wurde und damit maßgeblich die Effektorfunktion der sezernierten Antikörper (siehe Tab. 1) – bei gleichzeitig unveränderter Antigenpezifität – bestimmt (Dedeoglu et al., 2004). Dabei erfolgt die Auswahl der C-Region nicht zufällig, sondern wird durch das sekretierte Zytokinprofil der umgebenden  $T_{FH}$ -Zellen bestimmt (Stavnezer et al., 2008). Da die herausgeschnittenen Genabschnitte unwiderruflich verloren gehen, ist ein Klassenwechsel nur in eine Richtung, von IgM bzw. IgD über IgG und IgA bis zu IgE möglich.

Zusätzlich lassen sich Immunglobuline vom Typ IgG (Vidarsson et al., 2014) und IgA (Murphy und Weaver, 2018) in weitere Subklassen unterteilen. Die vier IgG-Subklassen kommen physiologisch in unterschiedlichen Mengen im Organismus vor, wobei IgG1 (60 %) und IgG2 (32 %) die quantitativ am häufigsten vorhandenen Subklassen darstellen (Vidarsson et al., 2014). Da den einzelnen Subklassen spezifische Eigenschaften in Bezug auf die Bindung eines Antigens und ihre Effektorfunktion aufweisen, ist zu

beachten, dass im Rahmen viraler Infektionen hauptsächlich die Subklassen IgG1 und IgG3 gebildet werden (Ferrante et al., 1990).

**Tab. 1:** Immunglobulinklassen und deren Eigenschaften

Tabellarische Darstellung der Haupteigenschaften der einzelnen Immunglobulinklassen und deren hauptsächlichliches Vorkommen im menschlichen Körper (Murphy und Weaver, 2018).

Immunglobulinklasse	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Struktur	Pentamer	Monomer	Dimer	Monomer	Monomer
Vorkommen	Blut	gesamter Körper	Schleimhäute	naive B-Lymphozyten	Mastzellen, Granulozyten
Komplementaktivierung	+	+	-	-	-
Opsonierung	+	+	-	-	-
Neutralisierung	+	+	+	-	-
Mastzelldegranulation	-	-	-	-	+
Plazentagängigkeit	-	+	-	-	-

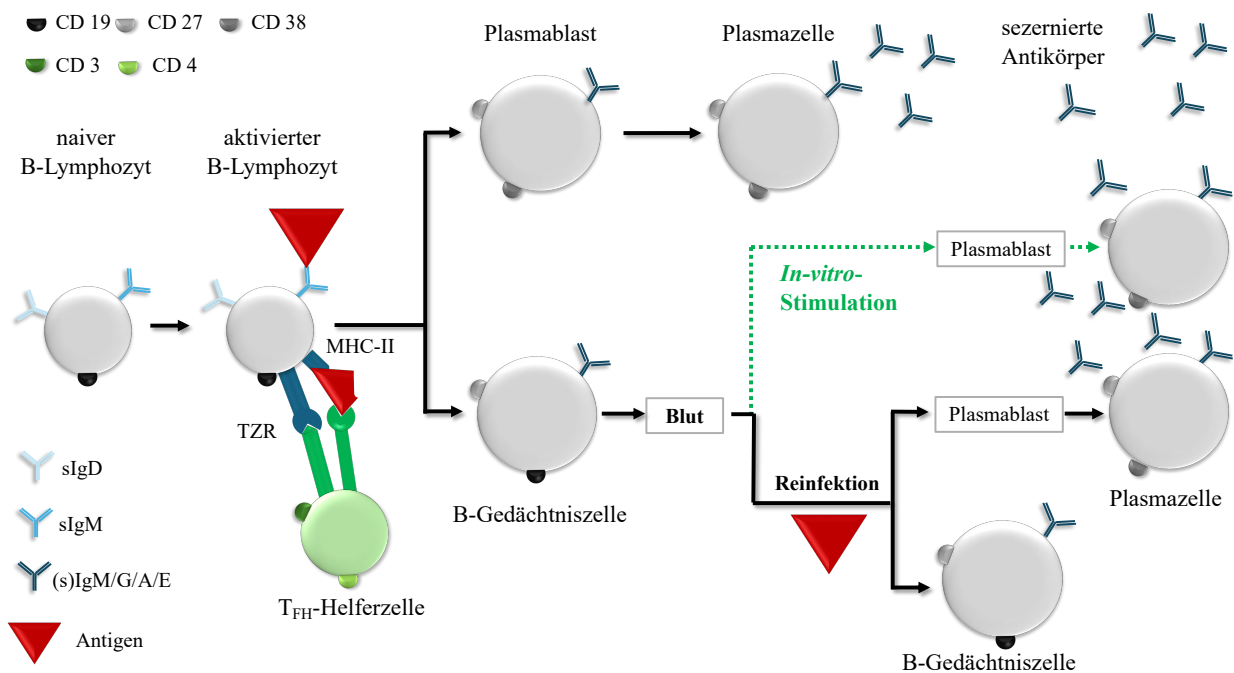
Durch die in diesem Abschnitt vorgestellten Mechanismen wird die Leistungsfähigkeit und Effizienz der humoralen Immunreaktion erheblich gesteigert. Nach Durchlaufen der genannten Reifungsprozesse differenzieren sich die B-Lymphozyten des Keimzentrums zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen, die sich durch eine gesteigerte Affinität ihrer synthetisierten Immunglobuline gegenüber dem Antigen auszeichnen. Unter diesen Zellen befinden sich auch langlebige Plasmazellen, welche ins Knochenmark auswandern und dort über einen langen Zeitraum Immunglobuline sekretieren (Hammarlund et al., 2017; Slifka et al., 1998), da die Aufrechterhaltung eines schützenden Antikörpertiters im Blut – bedingt durch die kurze Halbwertszeit von IgG von etwa 20 Tagen (Lawrence et al., 2017; Mankarious et al., 1988) – eine stetige Sekretion von Antikörpern voraussetzt. Dies bedingt unter anderem die von *Wolf et al.* demonstrierte, unzureichende Korrelation zwischen gemessenen Antikörpertitern im Serum und der Quantität von antigenspezifischen B-Gedächtniszellen, sodass Antikörpertiter im Blut keine verlässlichen Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines Immungedächtnisses oder vorherige Expositionen gegenüber einem Antigen zulassen (Wolf et al., 2022). Diese Beobachtungen konnten auch bei Humanen Immundefizienz-Virus-Patienten (Übersichtsartikel (Spivak et al., 2010)), Zytomegalievirus-seronegativen Individuen (Terlutter et al., 2018) und *Corona-*

*virus disease 2019* (COVID-19)-Patienten (Winklmeier et al., 2022; Wolf et al., 2022) gemacht werden.

### 1.3.3 Sekundäre Immunantwort

Das Immunsystem ist dazu befähigt ein Immungedächtnis auszubilden. Dadurch wird die Geschwindigkeit der adaptiven Immunreaktion bei einem erneuten Kontakt mit einem Pathogen nach Impfung oder Infektion drastisch erhöht, was häufig in einem inapparenten Krankheitsverlauf resultiert. Diese Beobachtungen sind besonders auf die B-Gedächtniszellen zurückzuführen, welche sich entweder im Rahmen der Keimzentrumsreaktion bilden oder aus Plasmazellen hervorgehen und anschließend in den sekundären lymphatischen Organen verweilen. Anhand der Expression vom Oberflächenrezeptor CD27 lassen sich diese B-Gedächtniszellen von naiven B-Lymphozyten abgrenzen (Klein et al., 1998; Shah et al., 2018). Gleichzeitig exprimieren B-Gedächtniszellen auf ihrer Zelloberfläche eine größere Menge an MHC-II-Molekülen und des costimulatorischen Liganden CD80, was eine effizientere Präsentation der Antigenfragmente und eine schnellere Anregung zur Immunglobulinsynthese durch die Interaktion mit dem CD80-Liganden CD28 der T<sub>FH</sub>-Zellen ermöglicht (Murphy und Weaver, 2018). Werden den B-Gedächtniszellen im Grenzbereich zwischen B- und T-Zell-Zone der Lymphknoten Antigenfragmente präsentiert, die diese mit ihren B-Zell-Rezeptor binden können, kommt es – ähnlich wie bei der primären Immunreaktion – zur Aktivierung dieser antigenspezifischen B-Lymphozyten.

Durch die bereits durchlaufene SHM, CSR und eine schnellere Aktivierung, differenzieren sich die B-Gedächtniszellen sehr viel schneller zu Plasmazellen als naive B-Lymphozyten, was in einer schnelleren Freisetzung von großen Mengen an spezifischen, hochaffinen Immunglobulinen (hauptsächlich IgG) resultiert (Ahmed und Gray, 1996; Cancro und Tomayko, 2021; Good und Tangye, 2007). Zusätzlich ist ein erneuter Eintritt der B-Gedächtniszellen in die Keimzentren möglich, sodass diese durch weitere SHM eine zusätzliche Affinitätssteigerung erfahren (Bende et al., 2007).



**Abb. 1:** Differenzierung der B-Lymphozyten und *In-vitro*-Stimulation

Nach Kontakt mit einem Antigen, das durch den IgM-Rezeptor der naiven B-Zelle gebunden wird, kommt es zur Aktivierung der B-Zelle und der anschließenden Präsentation von Peptidfragmenten des intrazellulär prozessierten Antigens über den MHC-II Komplex. Diese werden durch den TZR der antigenspezifischen T<sub>FH</sub>-Helferzelle gebunden, die daraufhin mit den B-Zellen interagiert und diese zur Proliferation anregt. Anschließend kann sich die aktivierte B-Zelle in den äußeren Follikelregionen zum IgM<sup>+</sup>-sezernierenden Plasmablasten und weiter zur Plasmazelle differenzieren, oder in die Primärfollikel eintreten, ein Keimzentrum ausbilden und dort die SHM und die CSR durchlaufen. Hierdurch erfolgt eine Steigerung der Affinität und die Synthese weiter ausgereifter Immunglobulinklassen. Anschließend differenzieren sich die B-Zellen des Keimzentrums entweder zu Antikörper-sezernierenden Plasmablasten und weiter zu Plasmazellen oder bilden als B-Gedächtniszelle das Immungedächtnis aus. Nach Abschluss des Differenzierungsprozesses emigrieren die B-Gedächtniszellen in den Blutstrom, um zwischen den sekundären lymphatischen Organen zu zirkulieren. Kommt es zu einer Reinfektion, so führt dies entweder zu einer Differenzierung der B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen, die eine schnelle und effiziente Eliminierung des Pathogens gewährleisten oder zur Affinitätssteigerung der B-Gedächtniszellen im Rahmen einer erneuten Keimzentrumsreaktion. Durch die *In-vitro*-Stimulation, der aus dem Blut gewonnenen B-Gedächtniszellen, werden diese künstlich zur Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Zellen stimuliert, sodass anschließend die Häufigkeit und Antigenspezifität ebendieser Zellen analysiert werden kann, wobei diese Stimulation insofern von den Verhältnissen *in vivo* abweicht, als das alle enthaltenen B-Gedächtniszellen – und nicht nur der Anteil der Zellen, der für das Antigen spezifisch ist – stimuliert werden. (eigene Darstellung)

Für das *Immune Monitoring*, eine noch junge medizinische Disziplin, die sich mit der immunologischen Abwehrlage des menschlichen Körpers beschäftigt, sind besonders diese beschriebenen Prozesse der B-Lymphozyten-vermittelten primären und sekundären Immunantwort von Interesse, da dessen vollumfängliches Verständnis bzw. weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet von großem Wert für mögliche therapeutische Ansätze in vielen medizinischen Disziplinen, von der Infektiologie, Allergologie bis hin zur Onkologie sein können.

#### 1.4 *In-vitro*-Stimulation

Zur Durchführung eines *Enzyme-linked immunospot* (ELISPOT)/FluoroSpot-Assays werden die im Blut enthaltenen Zellen des Immunsystems – für die Fragestellung dieser Arbeit die B-Lymphozyten – benötigt.

Die in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) enthaltenen B-Lymphozyten müssen vor der Durchführung eines FluoroSpot-Assays zur weiteren Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Zellen (ASZ) angeregt werden. Wie *in vivo* findet auch *in vitro* eine Sekretion von Antikörpern durch B-Zellen nicht spontan, sondern erst im Zuge eines Aktivierungs- und Differenzierungsprozesses statt (siehe 1.3.1 T<sub>FH</sub>-Zellen und 1.3.2 B-Lymphozyten). Während im menschlichen Körper ein komplexes Signal aus unterschiedlichen Zytokinen und Zellinteraktionen zwischen T<sub>FH</sub>- und B-Lymphozyten notwendig ist, um die B-Zellen in den Lymphfollikeln zur Reifung und Differenzierung zu Plasmazellen anzuregen, ist es durch seine Komplexität nicht möglich, diesen Signalweg vollständig *in vitro* zu reproduzieren.

Eine Ausnahme bilden langlebige Plasmazellen (Slifka et al., 1998), sowie zirkulierende Plasmablasten kurz nach Infektion oder Vakzinierung (Brieva et al., 1994; Jose-Cascon et al., 2022), da diese bereits das Stadium einer ASZ erreicht haben.

Folglich wurde durch die Wissenschaft *in vitro* auf unterschiedliche Stimulationsansätze zurückgegriffen, die Substanzen enthalten, um die ruhenden B-Zellen zur Antikörperproduktion anzuregen. Diese Arbeit bedient sich beispielsweise an einem Stimulationsansatz, welcher sich bereits in mehreren vorherigen Arbeiten für die Differenzierung von B-Lymphozyten zu ASZ bewährt hat. Dieser setzt sich aus rekombinantem (r)IL-2 und dem TLR-7/8-Agonisten Resiquimod (R848) zusammen; zwei Substanzen, die bereits von anderen wissenschaftlichen Arbeiten als potente Stimulatoren der B-Zell-Differen-

zierung beschrieben wurden (Jahnmatz et al., 2013; Pinna et al., 2009). Hierbei konnte besonders für IL-2 ein stark proliferativer Effekt auf die B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Mingari et al., 1984).

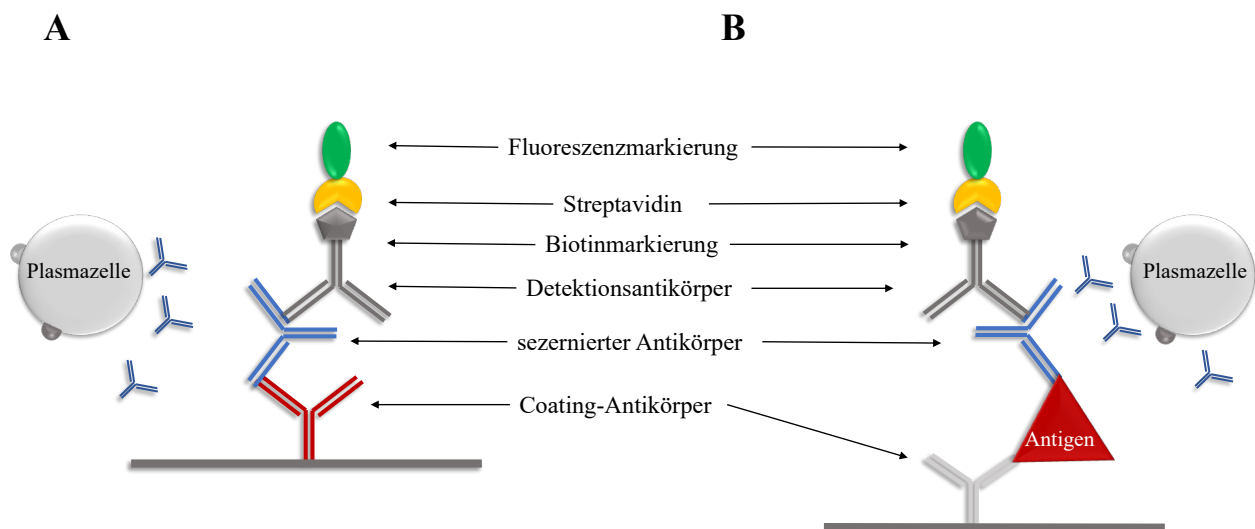
Parallel wurde auch ein von *Franke et al.* (2020) vorgestellter Stimulationsansatz, bestehend aus Anti-CD40, rIL-4 und rIL-21, verwendet. In ihrem Übersichtsartikel führen *Moens und Tangye* (2014) Anti-CD40 als Aktivator für die Proliferation, Differenzierung und Blastogenese der ruhenden B-Lymphozyten auf. Diese proliferative Wirkung wird durch IL-4 und IL-21 verstärkt, welche zusätzlich die CSR initiieren (Moens und Tangye, 2014). Es wird vermutet, dass das verwendete Zytokinprofil mehr Ähnlichkeit zur oben beschriebenen T-Zell-abhängigen Aktivierung der B-Lymphozyten aufweist und damit möglicherweise eine physiologischere Aktivierung – vorwiegend der B-Gedächtniszellen – ermöglicht (Ding et al., 2013; Nutt et al., 2015; Weinstein et al., 2016) (siehe Abb. 1).

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Kombinationen aus Stimulanzen wurden auch andere Substanzen, wie LPS, Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid, *Pokeweed mitogen* oder *Staphylococcus aureus* Cowan – bzw. unterschiedliche Kombinationen dieser Substanzen – im Rahmen der *In-vitro*-Differenzierung von B-Zellen erprobt und angewendet (Crotty et al., 2004; Jahnmatz et al., 2013; Marsman et al., 2022; Pinna et al., 2009; Scholzen et al., 2014).

### 1.5 ELISPOT-/FluoroSpot-Assay

Die ELISPOT-Technik wurde erstmalig 1983 beschrieben (Czerkinsky et al., 1983) und zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität aus, wobei sie in ihrer Methodik dem *Enzyme-linked Immunosorbent assay* (ELISA) sehr ähnlich ist. Dennoch weist sie einige wichtige Unterschiede auf. So ist es – im Gegensatz zum ELISA – mit dem ELISPOT-Assay möglich, eine Aussage über die Anzahl der sekretorisch aktiven Zellen zu treffen. Um allerdings ASZ nachweisen zu können, müssen die zu untersuchenden B-Zellen vor Durchführung des Assays in einem Nährmedium stimuliert und zur Differenzierung sowie Antikörperproduktion angeregt werden (siehe 1.4 *In-vitro*-Stimulation). Anschließend wird eine festgelegte Anzahl an Zellen auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht und erneut inkubiert. Während dieser erneuten Inkubationsphase werden die sezernierten Immunglobuline über *Coating*-Antikörper oder Antigene auf der Platte gebunden. Anschließend können mithilfe von sekundären und tertiären fluoreszenzmarkierten (FluoroSpot) oder

enzymmarkierten (ELISPOT) Antikörpern, die gebundenen, sezernierten Antikörper sichtbar gemacht werden. Bei der Visualisierung entspricht jeder detektierte *Spot* der Sekretionsleistung einer einzelnen B-Zelle, da die sezernierten Immunglobuline im direkten Umfeld der sekretorisch aktiven Zelle gebunden werden. Somit lässt sich sehr präzise beschreiben, wie viele der hinzugefügten Zellen zum Zeitpunkt der Durchführung des Assays die Differenzierung zur ASZ abgeschlossen haben und während der Inkubationsperiode sekretorisch aktiv waren.



**Abb. 2:** Funktionsschema des FluoroSpot-Assays

Zur Bindung der sezernierten Antikörper wird die Membran mit einem *Coating*-Antikörper (**A**) oder einem Antigen inkubiert, welches über seine Histidinmarkierung von einem *Coating*-Antikörper auf der Membran fixiert wird (**B**). Anschließend erfolgt die Zugabe der stimulierten PBMC, die unter anderem ASZ enthalten. In der darauffolgenden Inkubationsperiode kommt es zur Sekretion von Immunglobulinen, die entsprechend ihrer Spezifität an das an die Membran gebundene Antigen binden oder von dem verwendeten *Coating*-Antikörper gebunden werden. Nach Abschluss der Inkubationsperiode und einem sich anschließenden Waschschrift erfolgt die Zugabe eines sekundären Antikörpers, der sich gegen spezifische Epitope der sezernierten Immunglobuline richtet und mit einem Marker (z. B. Biotin) versehen wurde. Anschließend erfolgt die Zugabe einer Fluoreszenzmarkierung, die z. B. an ein Streptavidin-Molekül gebunden ist, welches sich gegen das Biotin des sekundären Antikörpers richtet. Durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit Licht einer spezifischen Wellenlänge erfolgt eine Lichtemission, wodurch die gebundenen Antikörper in Form fluoreszierender *Spots* sichtbar gemacht werden können. Hierbei entspricht jeder *Spot* der Sekretionsleistung einer einzelnen ASZ. (modifiziert nach (Köppert, 2022))

Zusätzlich gibt die Morphologie – das heißt die Fluoreszenzintensität und Größe der *Spots* – Aufschluss über die Sekretionsleistung der ASZ (Karulin und Lehmann, 2012), die Affinität der sezernierten Immunglobuline gegenüber dem Antigen (Becza et al., 2024; Karulin und Lehmann, 2012) und etwaige Zellwanderungen im Inkubationszeitraum. Ein besonderer Vorteil der FluoroSpot-Technik ist die Möglichkeit, sogenannte Multiplex-Assays durchführen zu können (Caspell und Lehmann, 2018). Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, wie Tetramethylrhodamin (TRITC), Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 oder Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP) durch unterschiedliche Wellenlängen zur Lichtemission angeregt werden und Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, ist durch die Kombination verschiedener Fluoreszenzmarkierungen in einem Detektionssystem eine gleichzeitige Bestimmung der unterschiedlichen Immunglobulinklassen/-subklassen in einem einzelnen Assay möglich. Hierdurch lässt sich z. B. neben der Antigenpezifität der stimulierten B-Gedächtniszellen auch direkt die Häufigkeitsverteilung der sezernierten Immunglobulinklassen/-subklassen evaluieren, was wichtige Informationen – nicht nur über die relative Häufigkeit und qualitative/quantitative Zusammensetzung einer Immunantwort – sondern auch über mögliche vorherige CSR bei der *In-vitro*-Differenzierung der B-Lymphozyten, offenbart.

## 1.6 COVID-19

COVID-19 ist eine Atemwegserkrankung, die durch eine Infektion mit dem *Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2) ausgelöst wird und erstmalig Ende 2019 in der chinesischen Provinz Wuhan beschrieben wurde (Zhu et al., 2020). Das Virus exprimiert auf seiner Oberfläche die Rezeptorbindungsdomäne (RBD), welche ein Bestandteil des Spike (S)-Antigens ist, und die Andockung des Virus an seine Zielzelle und den anschließenden Viruseintritt – und somit die Infektion des Organismus – ermöglicht (Letko et al., 2020). Hieraus lässt sich die Bedeutung dieser Antigenstruktur für die Impfstoffentwicklung ableiten, da Antikörper, die sich gegen die RBD oder das S-Antigen richten, die Adsorption des Virus und damit den Viruseintritt und die Infektion des Organismus verhindern. Neben den beschriebenen Oberflächenantigenen enthalten Coronaviren in ihrem Inneren Nukleokapsid (NCAP)-Proteine, welche die virale RNA umhüllen (de Haan und Rottier, 2005).

Die Verbreitung des Virus führte zur COVID-19-Pandemie (WHO, 2020), welche zur weltweiten Entwicklung von über 100 Impfstoffen führte (Übersichtsartikel (Fiolet et al., 2022)). Die entwickelten Impfstoffe basieren dabei entweder auf *messenger*-RNA (mRNA), viralen Vektoren oder inaktivierten Viren bzw. Virusbestandteilen (Fiolet et al., 2022), wobei in dieser Arbeit Impfantworten gegenüber mRNA-Impfstoffen untersucht wurden. Die Evaluation der Impfantworten erfolgte mit dem durch unsere Forschungsgruppe etablierten FluoroSpot-Assay für die SARS-CoV-2-Antigene RBD, S und NCAP (Becza et al., 2024; Köppert et al., 2021; Wolf et al., 2022).

### 1.7 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die sich durch inflammatorische Läsionen und die sich anschließende Zerstörung der Myelinscheiden im ZNS auszeichnet. Weltweit sind etwa 2,8 Millionen Menschen erkrankt (Walton et al., 2020). Die klinische Symptomatik der MS ist sehr variabel und abhängig von der betroffenen Region des ZNS, wobei als häufiges Initialsymptom eine einseitige Entzündung des Sehnervs und eine daraus resultierende Visusverminderung, eine Veränderung des Farbsehens oder eine schmerzhafte Bulbusmotilität beschrieben werden (Ford, 2020). Des Weiteren kann sich die MS durch sensorische Defizite – bei Läsionen im Rückenmark – oder durch Hirnstammsymptomen bemerkbar machen (Ford, 2020). Klinisch wird zwischen verschiedenen Verlaufsformen der MS unterschieden, wobei die neurologischen Symptome – in der Abwesenheit von Fieber oder Infektionszeichen – mindestens über 24 Stunden oder länger anhalten müssen, um *per definitionem* als Schub klassifiziert zu werden (Übersichtsartikel Dobson und Giovannoni, 2019; Katz Sand, 2015). Die verschiedenen Verlaufsformen sind in *Tab. 2* dargestellt.

Da die Ätiologie weiterhin unklar und Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen ist, stellt die MS eine Ausschlussdiagnose dar. Zur Diagnosestellung wird in der klinischen Praxis auf die Detektion von Demyelinisierungsherden an typischen Lokalisationen im ZNS in der Magnetresonanztomographie (MRT) und Veränderungen im zerebrospinalen Liquor zurückgegriffen (Ford, 2020). Unterstützend können zur Diagnosestellung die McDonald-Kriterien herangezogen werden (Thompson et al., 2018).

**Tab. 2:** Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

Tabellarische Darstellung der Verlaufsformen der MS mit ihren Hauptcharakteristika (Dobson und Giovannoni, 2019; Katz Sand, 2015).

Verlaufsform	Charakteristika
Klinisch isoliertes Syndrom (KIS)	Klinische Zeichen einer Exazerbation ohne bildmorphologische Auffälligkeiten im MRT
Radiologisch isoliertes Syndrom (RIS)	Bildmorphologische Auffälligkeiten im MRT ohne neurologische Symptome
Schubförmig remittierende MS (RRMS)	Akute Exazerbationen mit (un-) vollständigem Rückgang der Symptome und einer sich anschließenden Phase der klinischen Stabilität/Symptomfreiheit
Primär progrediente MS (PPMS)	Progressive Verschlechterung der neurologischen Symptome über mindestens ein Jahr ohne Rückbildung der Symptome
Sekundär progrediente MS (SPMS)	Progressive Verschlechterung der neurologischen Symptome ohne Rückbildung (10 - 15 Jahre nach Beginn der RRMS)

Die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse lassen eine autoimmunbedingte, vor allem T-Zell-, aber auch B-Zell-vermittelte Pathogenese vermuten (Kuerten et al., 2014; van Langelaar et al., 2020). Im Rahmen der B-Zell-vermittelten Autoimmunität konnten verschiedene potenzielle Zielstrukturen der Oligodendrozyten identifiziert werden. Hierzu zählt neben Proteinen der Myelinscheiden (Reindl et al., 1999; Weber et al., 2011) unter anderem auch GlialCAM (Synonym: HepaCAM) (Lanz et al., 2022). GlialCAM ist ein Transmembranprotein mit zwei extrazellulären, Ig-ähnlichen Domänen und unter anderem an der Zelladhäsion zwischen den Astrozyten beteiligt (Favre-Kontula et al., 2008; Lopez-Hernandez et al., 2011). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass GlialCAM an der Lokalisation des Ionenkanals *Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1* (MLC1) an den Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Astrozyten beteiligt ist (Lopez-Hernandez et al., 2011) und außerdem als Chaperon an der korrekten Faltung des MLC1-Proteins mitwirkt (Capdevila-Nortes et al., 2013).

Eine Studie von *Dahl et al.* konnte darüber hinaus erhöhte Antikörpertiter gegenüber dem MLC1 bei MS-Patienten nachweisen, wobei noch unklar ist, ob und welche Rolle dieses Antigen bei der Pathogenese der MS spielt oder ob eine Reaktivität gegenüber diesem Ionenkanal nur hinweisend auf ein überreaktives Immunsystem sein könnte, da auch erhöhte Antikörpertiter im Hirnwasser von Patienten mit anderen neuroinflammatorischen Erkrankungen nachgewiesen werden konnten (Dahl et al., 2025).

Zusätzlich konnten *Lanz et al.* in ihrer Studie neben erhöhten Antikörpertitern gegen GlialCAM im Blut von MS-Patienten auch eine Kreuzreaktivität der GlialCAM-Antikörper mit *Epstein-Barr nuclear antigen 1* (EBNA1), einem Protein des Epstein-Barr-Virus (EBV), nachweisen (*Lanz et al.*, 2022) und so eine Assoziation zwischen einer EBV-Infektion und der Ausbildung einer MS aufzeigen.

Auch ein Einfluss des Mikrobioms des Verdauungstraktes auf die Entstehung einer MS wird diskutiert. In dem Zusammenhang gelang *Pröbstel et al.* (2020) der Nachweis von IgA<sup>+</sup>-sezernierenden B-Zellen – deren Spezifität gegen Darmkeime gerichtet ist – in den entzündlichen Läsionen von MS-Erkrankten, sodass eine Einwanderung von IgA<sup>+</sup>-sezernierenden B-Zellen aus dem Darm ins ZNS vermutet wird. Studien an Mäusen konnten hierbei aufzeigen, dass diese IgA<sup>+</sup>-sezernierende B-Zellen dort eine regulatorische, anti-inflammatorische und damit protektive Wirkung aufweisen (*Rojas et al.*, 2019).

Als weitere Risikofaktoren für die Ausbildung einer MS werden genetische Faktoren, Rauchen, ein hoher Körpermasseindex und niedrige Vitamin D-Spiegel diskutiert (*Amato et al.*, 2018).

In der Therapie der MS finden unter anderem monoklonale Antikörper Verwendung, die die Funktionalität der B-Zellen hemmen. In diesem Zusammenhang ist besonders Rituximab, ein monoklonaler Antikörper, der gegen das Oberflächenantigen CD20 der B-Zellen gerichtet ist, hervorzuheben (*Chisari et al.*, 2022).

Dies verdeutlicht nicht nur die Rolle der B-Zell-vermittelten Autoimmunität in der Pathogenese der MS, sondern auch die Bedeutung der Entwicklung von Assays, die die B-Zell-vermittelte Reaktivität gegenüber potenziellen Antigenen evaluieren. Die Etablierung eines FluoroSpot-Assays zur Evaluation der B-Zell-vermittelten Autoimmunität gegenüber einem potenziellen neuen Antigen der MS ist ein Teil dieser Arbeit.

## 1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit sollen zwei etablierte Stimulationsansätze verglichen werden, welche sich bereits in mehreren vorherigen Arbeiten als potente Stimulatoren für die Differenzierung von B-Lymphozyten zu ASZ bewährt haben (siehe 1.4 *In-vitro*-Stimulation). Die verwendeten PBMC sollen sowohl mit rIL-2 und R848 (*Jahnmatz et al.*, 2013; *Pinna et al.*, 2009) als auch Anti-CD40, rIL-4 und rIL-21 (*Franke et al.*, 2020) zur Differenzierung angeregt werden. Dabei variiert die in der Literatur beschriebene, notwendige Kultivier-

ungsdauer zur Durchführung eines ELISPOT-/FluoroSpot-Assays zwischen 3 und 9 Tagen (Crotty et al., 2004; Fecher et al., 2018; Franke et al., 2020; Heidt et al., 2012; Jahnmatz et al., 2013; Jourdan et al., 2009; Marsman et al., 2022; Pinna et al., 2009; Weiss et al., 2012), woraus sich die Fragestellung der nachfolgenden Arbeit, nach der optimalen Kultivierungsdauer im Rahmen einer *In-vitro*-Stimulation, die die B-Zellen zur Differenzierung aus ihrem ruhenden Stadium in ASZ benötigen, ableiten lässt. Hierbei sollen nicht nur etwaige kinetische Unterschiede in der Stimulation bzw. Differenzierung der unterschiedlichen (Sub-) Klassen-sezernierenden ASZ mit den beiden ausgewählten Stimulationsansätze evaluiert werden, sondern auch ein besonderes Augenmerk auf antigenspezifische ASZ gelegt werden, da diese besonders im Hinblick auf Fragestellungen im Rahmen des *Immune Monitorings* von großem Interesse sind.

## 2. Material und Methoden

Die Mehrheit der in dieser Arbeit aufgeführten Experimente wurden bei *Cellular Technology Limited* (CTL, Shaker Heights, Ohio, USA) durchgeführt. Die Experimente zur klinischen Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse im Rahmen der MS-Forschung wurden am Anatomischen Institut des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt und bedienen sich derselben Methodik wie die Experimente bei CTL. Zur besseren Übersicht werden nur etwaige Unterschiede explizit in der Methodik erwähnt und bei der Verwendung von unterschiedlichen Materialien und/oder Reagenzien zur Durchführung der Experimente an der Universität Bonn diese gesondert aufgeführt. Bei keiner gesonderten Aufführung wurden an beiden Standorten die gleichen Materialien, Reagenzien und/oder Methodik verwendet.

Alle Untersuchungen sind auf Grundlage der revidierten *Deklaration von Helsinki* des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt worden.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 PBMC

Für die Zellkulturen wurde auf kryokonservierte PBMC aus der PBMC-Bank des Unternehmens CTL (ePBMC<sup>®</sup>, Cellular Technology Limited, Shaker Heights, Ohio, USA) und des Anatomischen Institutes des Universitätsklinikums Bonn zurückgegriffen. Die einkernigen Blutzellen wurden im Rahmen einer Blutentnahme mittels Dichtegradientenzentrifugation aus den Vollblutspenden erwachsener Probanden herausgefiltert und enthalten hauptsächlich Monozyten und Lymphozyten, aber auch andere einkernige Zellen des Immunsystems, wie z. B. dendritische Zellen und NK-Zellen (Kleiveland, 2015). Etwa 5 - 10 % der enthaltenen Zellen sind B-Lymphozyten (Kleiveland, 2015).

Die PBMC der PBMC-Bank von CTL wurden von *Hemacare* (Van Nuys, California, USA) (Biorepository-Protokoll 001, genehmigt von der externen *Advarra*-Ethikkommission) oder vom Amerikanischen Roten Kreuz (Atlanta, Georgia, USA) (Protokollnummer 2016-030, genehmigt von der internen Ethikkommission) gesammelt und an CTL verkauft. Die im Rahmen der Untersuchungen zu COVID-19 verwendeten PBMC wurden vom Amerikanischen Roten Kreuz, *BioIVT* (Westbury, New York, USA) oder *Stem Express* (Folsom,

California, USA) unter IRB-Genehmigung rekrutiert und anschließend an CTL verkauft. Zusätzlich wurden Spenderproben intern bei CTL im Rahmen einer von der externen *Advarra*-Ethikkommission genehmigten Studie (#Pro00043178, CTL-Studiennummer: GL20-16 mit dem Titel „COVID-19 Immune Response Evaluation“) gesammelt.

Für die Experimente an der Universität Bonn wurden PBMC durch Mitarbeiter des Universitätsklinikums gewonnen und kryokonserviert. Ein Ethikantrag (Aktenzeichen: 2025-61-BO) für die Durchführung der Studie mit humanen PBMC wurde am 27.03.2025 durch die *Ethikkommission für klinische Versuche am Menschen und epidemiologische Forschung mit personenbezogenen Daten* der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt.

Alle Spender gaben ihre mündliche und schriftliche Einwilligung zur Verwendung des Materials für Forschungszwecke und ihre Identitäten wurden durch die Verwendung von pseudonymisierten Codes geschützt.

### 2.1.2 Coating-Antikörper

**Tab. 3:** Coating-Antikörper

	Bezeichnung	Details	Hersteller
<b>CTL</b>			
	Purified Anti-His Tag Antibody	Klon: J099B12 Artikelnummer: 652502 Konzentration: 0,5 mg/ml	Biologend (San Diego, California, USA)
	Anti-Human Kappa-UNLB	Artikelnummer: 2060-01 Konzentration: 1 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
	Goat Anti-Human Lambda-UNLB	Artikelnummer: 2070-01 Konzentration: 1 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)

### 2.1.3 Detektionsantikörper

Die aufgelisteten Detektionsantikörper wurden für den FluoroSpot-Assay und/oder für den ELISA verwendet.

**Tab. 4: Detektionsantikörper**

Bezeichnung	Details	Hersteller
<b>CTL</b>		
AffiniPure® Rabbit Anti-Human IgM, Fc5µ fragment specific	Artikelnummer: 309-005-095 Konzentration: 1,8 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)
Alexa Fluor® 488 AffiniPure® Goat Anti-Human IgM	Artikelnummer: 109-545-129 Konzentration: 1,5 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)
Alexa Fluor® 488 AffiniPure® Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific	Artikelnummer: 109-545-011 Konzentration: 1,5 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)
Goat Anti-Human IgA-BIOT	Artikelnummer: 2050-08 Konzentration: 0,5 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Goat Anti-Human IgG Fc, Multi-Species SP ads-HRP	Artikelnummer: 2014-05 Konzentration: unbekannt	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Mouse Anti-Human IgE Fc-BIOT	Klon: B3102E8 Artikelnummer: 9160-08 Konzentration: 0,5 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Mouse Anti-Human IgG1 Hinge-HRP	Klon: 4E3 Artikelnummer: 9052-05 Konzentration: unbekannt	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Mouse Anti-Human IgG2 Fc-BIOT	Klon: HP6002 Artikelnummer: 9070-08 Konzentration: 0,5 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Mouse Anti-Human IgG3 Hinge-Alexa Fluor® 488	Klon: HP6050 Artikelnummer: 9210-30 Konzentration: 0,5 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Mouse Anti-Human IgG4 pFc'-UNLB	Klon: HP6023 Artikelnummer: 9190-01 Konzentration: 0,5 mg/ml	SouthernBiotech (Birmingham, Alabama, USA)
Rhodamine (TRITC) AffiniPure® Goat Anti-HRP	Artikelnummer: 123-025-021 Konzentration: 1,5 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)
DyLight® 405 AffiniPure® Goat Anti-Mouse IgG, Fcy subclass 3 specific	Artikelnummer: 115-475-209 Konzentration: 1,7 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)
DyLight® 405 AffiniPure™ Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Artikelnummer: 711-475-152 Konzentration: 1,5 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)
PerCP Streptavidin	Artikelnummer: 405213 Konzentration: 0,2 mg/ml	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Universität Bonn</b>		
DyLight® 405 AffiniPure® Goat Anti-Horseradish Peroxidase	Artikelnummer: 123-475-021 Konzentration: 1,5 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire, UK)

### 2.1.4 Antigene

Die aufgeführten Antigene wurden sowohl für den FluoroSpot-Assay als auch für den ELISA verwendet.

**Tab. 5: Antigene**

Bezeichnung	Details	Hersteller
<b>CTL</b>		
Hexa-His	Artikelnummer: RP11737-5 Konzentration: 2,5 mg/ml	GenScript (Piscataway, New Jersey, USA)
A/California/07/2009 rHA (H1N1)	Artikelnummer: p7871 Konzentration: 3,01 mg/ml	Center for Vaccines and Immunology (CVI) (University of Georgia, Athens, Georgia, USA)
A/Texas/50/2012 rHA (H3N2)	Artikelnummer: H3-7872 Konzentration: 5,56 mg/ml	Center for Vaccines and Immunology (CVI) (University of Georgia, Athens, Georgia, USA)
SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein	Artikelnummer: C19-20296 Konzentration: 7,26 mg/ml	Center for Vaccines and Immunology (CVI) (University of Georgia, Athens, Georgia, USA)
SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein	Artikelnummer: 230-30164 Konzentration: 7,26 mg/ml	Ray Biotech (Peachtree Corners, GA, USA)
<b>Universität Bonn</b>		
EBNA1	Artikelnummer: AB138345 Konzentration: 1,45 mg/ml	Abcam Ltd. (Cambridge, UK)
HepaCAM	Artikelnummer: 519783 Konzentration: 1 mg/ml	NovoPro Bioscience Inc. (Shanghai, Shanghai)
Human Membrane Protein MLC1-VLPs	Artikelnummer: CSB-MP613581HU(A5) Konzentration: 1 mg/ml	Cusabio Technology LLC (Houston, Texas, USA)

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Die aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden bereits fertig von den angegebenen Herstellern bezogen oder im Labor frisch angesetzt. Für selbst zubereitete Lösungen wurden die Anteile der beigefügten Substanzen angegeben. Die verwendeten Substanzen sind zusätzlich entweder in *Tab. 6* oder *Tab. 7* aufgeführt.

**Tab. 6: Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Details	Hersteller
<b>CTL</b>		
Lonza® BioWhittaker® RPMI 1640 without L-Glutamine	Artikelnummer: 12-167Q	Lonza (Walkersville, Maryland, USA)
Cell Culture Grade Water	Artikelnummer: 25-055-CV	Corning (Corning, New York, USA)
Carbonate Buffer	0,1 M pH 9,5	
Lonza® BioWhittaker® RPMI 1640 without L-Glutamine	Artikelnummer: 12-167Q	Lonza (Walkersville, Maryland, USA)
Cell Culture Grade Water	Artikelnummer: 25-055-CV	Corning (Corning, New York, USA)
Carbonate Buffer	0,1 M pH 9,5	
ELISA Blocking Buffer	PBS 2 % Bovine Serum Albumin 0.05 % TWEEN® 20	
Phospahte Buffered Saline without calcium, magnesium (PBS)	Artikelnummer: SH30028.02	Cytiva (Marlborough, Massachusetts, USA)
Phospahte Buffered Saline without calcium, magnesium (PBS) 10 X	Artikelnummer: SH30378.03	Cytiva (Marlborough, Massachusetts, USA)
TWEEN® 20	Artikelnummer: P9416-100ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
PBS-Tween	PBS 0,05 % TWEEN® 20	
B-cell Media (BCM)	RPMI 1640 10 % FBS 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin 10 % L-Glutamin 1 mM Sodium Pyruvate 8 mM HEPES 50 µM 2-Mercaptoethanol	
ELISPOT Diluent B	98,95 % PBS 1 % Bovine Serum Albumin 0.05 % Tween 20	
ELISPOT Diluent C	98,95 % PBS 1 % Bovine Serum Albumin	
CTL-Wash™ Supplement 10x	Artikelnummer: CTLW-010	Cellular Technology Limited (Shaker Heights, Ohio, USA)
CTL-Wash Medium	89 % RPMI 1640 10 % CTL-Wash™ Supplement 10x 1 % L-Glutamine 50 U/ml EMPROVE® Bio Benzonase® Nuklease	Cellular Technology Limited (Shaker Heights, Ohio, USA)
1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate	Artikelnummer: 34021 Konzentration: 0,2 mg/ml	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

1 M HCl		
Ethanol (95 %)	Artikelnummer: AC61511-0010	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
<b>Universität Bonn</b>		
Gibco™ RPMI Medium 1640 mit L-Glutamin	Artikelnummer: 21875-034	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Phospahte Buffered Saline (PBS)	Artikelnummer: 806552-1L	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
TWEEN® 20	Artikelnummer: 9127.2	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

## 2.1.6 Weitere Substanzen

**Tab. 7:** Weitere Substanzen

	Bezeichnung	Details	Hersteller
	<b>CTL</b>		
	BenchMark® Fetal Bovine Serum	Artikelnummer: 100-106	Gemini Bioproducts (West Sacramento, California, USA)
	Gibco™ HEPES (1 M)	Artikelnummer: 15630-080	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Artikelnummer: 15140-122	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	L-Glutamine	Artikelnummer: 25030-081	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Sodium Pyruvat (100 mM)	Artikelnummer: 11360-070	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	2-Mercaptoethanol	Artikelnummer: M6250-250ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
	EMPROVE® Bio Benzonase® Nuklease	Artikelnummer: 1.01697.0001	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
	Bovine Serum Albumin	Artikelnummer: 10735078001	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
	R848	Artikelnummer: ALX-420-038-M005 Konzentration: 1 mg/ml	Enzo Biochem Inc. (Farmingdale, New York, USA)
	Recombinant Human IL-2	Artikelnummer: 200-02 Konzentration: 10 µg/ml	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Recombinant Human IL-4	Artikelnummer: 1 204-IL Konzentration: 30 ng/ml	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA)
	Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD40 Antibody	Artikelnummer: 334350 Konzentration: 1 µg/ml	Biolegend (San Diego, CA, USA)

Recombinant Human IL-21	Artikelnummer: 38879-IL Konzentration: 50 ng/ml	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA)
CTL-LDC™ Live/Dead Cell Counting Dye	Artikelnummer: LDCD-050	Cellular Technology Limited (Shaker Heights, Ohio, USA)
Immunglobulin G, Human Plasma	Artikelnummer: 16-16- 090707 Konzentration: 1 mg/ml	Athens Research Technology (Athens, Georgia, USA)
Human IgE monoclonal Antibody	Artikelnummer: 401152 Konzentration: 1,18 mg/ml	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Universität Bonn</b>		
Gibco™ Fetal Bovine Serum	Artikelnummer: 10500-064	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Bovine Serum Albumin	Artikelnummer: 1ET6.4	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblaulösung 0,4 %	Artikelnummer: 1680.1	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

## 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 8:** Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Details	Hersteller
<b>CTL</b>			
	Corning® EIA/RIA-Assay-96-Mikrotiterplatten	Artikelnummer: 3590	Corning (Corning, New York, USA)
	Immulon® 4HBX 96-Well-Mikrotiterplatten	Artikelnummer: 3855	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	MultiScreen HTS-IPFL, 0,45 µm, transparent, steril	Artikelnummer: S5EJ104107	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
	Multiwellplatte für Suspensionskultur, 24-Well	Artikelnummer: 662102	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
	Nunc™ 96-Well Polystyrene Round Bottom Microwell Plates	Artikelnummer: 268200	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Corning® flask, canted neck, 25 cm <sup>2</sup> , vented	Artikelnummer: CLS431463-200EA	Corning (Corning, New York, USA)
	Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg-Filtrationsgeräte	Artikelnummer: 564-0020	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Axygen® 25 mL Disposable Reagent Reservoir, steril	Artikelnummer: RES-V-25-S	Corning (Corning, New York, USA)
	Conical tubes 50 ml (polyprop)	Artikelnummer: 339652	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Conical tubes 15 ml (polyprop)	Artikelnummer: 339650	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Pipette Tips RT UNV 1000 µl F 768A/8	Artikelnummer: 30389165	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Pipette Tips RT UNV 100 µl F 960A/10	Artikelnummer: 30389170	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Pipette Tips RT UNV 10 µl FG 960A/10	Artikelnummer: 30389175	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Nunc™ Serologische Pipetten 25 ml	Artikelnummer: 170357N	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Nunc™ Serologische Pipetten 10 ml	Artikelnummer: 170356N	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Nunc™ Serologische Pipetten 5 ml	Artikelnummer: 170355N	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Nunc™ Serologische Pipetten 2 ml	Artikelnummer: 170354N	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Millex-VV Syringe Filter Unit, 0.1 µm, PVDF	Artikelnummer: SLVVR33RS	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Universität Bonn</b>		
Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> , Filter-Schraubverschluss	Artikelnummer: 690175	greiner bio-one (Frickhausen, Deutschland)
BRAND® reagent reservoir PP for multichannel pipette	Artikelnummer: BR703409-200EA	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Konisches Zentrifugenröhrchen 50 ml (polyprop)	Artikelnummer: 62.547.254	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Konisches Zentrifugenröhrchen 15 ml (polyprop)	Artikelnummer: 62.554.502	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitze 1000 µl	Artikelnummer: 70.3030.110	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
300 µl graduiert TipOne® Pipettenspitze	Artikelnummer: S1110-9000	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)
200 µl graduiert TipOne® Pipettenspitze	Artikelnummer: S1111-0800	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)
SafeSeal SurPhob Spitzen, 100 µl	Artikelnummer: VT0230	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
SafeSeal SurPhob Spitzen, 20 µl	Artikelnummer: VT0220	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitze, 10 µl	Artikelnummer: 70.3010.210	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)

## 2.1.8 Technische Geräte

**Tab. 9:** Technische Geräte

Bezeichnung	Details	Hersteller
<b>CTL</b>		
Immunospot <sup>®</sup> S6 Universal M2		Cellular Technology Limited (Shaker Heights, Ohio, USA)
Thermo Scientific <sup>™</sup> Forma <sup>™</sup> 310 Direct-Heat CO <sub>2</sub> -Inkubator	Seriennummer.: 304550-67	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Accu-jet <sup>®</sup> pro	Artikelnummer: 263 30	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Pipet-Lite <sup>™</sup> XLS+ manual single-channel pipette, 100-1000 µl	Artikelnummer: 17014382	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Pipet-Lite <sup>™</sup> XLS+ manual single-channel pipette 20-200 µl	Artikelnummer: 17013805	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Pipet-Lite <sup>™</sup> XLS+ manual single-channel pipette, 10-100 µl	Artikelnummer: 17014408	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Pipet-Lite <sup>™</sup> XLS+ manual single-channel pipette 2-20 µl	Artikelnummer: 17014412	Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)
Biological Safety Cabinet (BSC 11)	Modellnummer: 1286	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Centrifuge (C8)	Modellnummer: GS-6R	Beckman Coulter Inc. (Brea, California, USA)
Bead bath	Seriennummer: 1450202N0046	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
BioTek EL406 Microplate Washer Dispenser 406PUB1	Modellnummer: SM100078-406PUB1-2WR	Agilent Technologies (Santa Clara, California, USA)
SpectraMax 190 Microplate Reader		Molecular Devices (San Jose, California, USA)
MultiScreen <sup>®</sup> HTS Vacuum Manifold	Modellnummer: MSVMHTS00	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Universität Bonn</b>		
Heracell <sup>™</sup> 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator, 150 L	Seriennummer: 51032720	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Pipetus <sup>®</sup>	Artikelnummer: 9212010	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
PIPETMAN <sup>™</sup> P1000, 100-1000 µl	Artikelnummer: F144059M	Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)
PIPETMAN <sup>™</sup> P200, 20-200 µl	Artikelnummer: F144058M	Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)
PIPETMAN <sup>™</sup> P20, 2-20 µl	Artikelnummer: F144056M	Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)

PIPETMAN™ P10, 1-10 µl	Artikelnummer: F144055M	Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)
Transferpette® 8, 10-100 µl	Artikelnummer: S12451	Brand GmbH & CO KG (Wertheim, Deutschland)
Transferpette® S-12, 30-300 µl	Artikelnummer: 705932	Brand GmbH & CO KG (Wertheim, Deutschland)
Herasafe HS 12 230 V	Modellnummer: 51016687	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Centrifuge 5920 R	Modellnummer: 5920 R	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
GFL Schüttelwasserbad 1083	Modellnummer: 011814	LAUDA DR. R. WOBSEER GmbH & CO. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Countess™ 3 FL Automated Cell Counter	Modellnummer: AMQAF2000	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In-vitro*-Stimulation

#### 2.2.1.1 Herstellung des Stimulationsmediums

Vor Beginn jeder Zellkultur wurde unter sterilen Kautelen das Kultur- bzw. Stimulationsmedium angefertigt. Hierfür wurde das B-Zell-Medium (BCM) mit bereits beschriebenen Substanzen zur *In-vitro*-Stimulation versetzt (Franke et al., 2020; Jahnmatz et al., 2013; Köppert et al., 2021; Pinna et al., 2009):

Stimulationsansatz 1:

R848 (2 µg/ml) + rIL-2 (10 ng/ml)

Stimulationsansatz 2:

Anti-CD40 (1 µg/ml) + rIL-4 (30 ng/ml) + rIL-21 (50 ng/ml)

Anmerkung: Im folgenden Text wird zur besseren Lesbarkeit auf die Aufzählung der einzelnen Stimulanzen verzichtet und stattdessen die Bezeichnung *Stimulationsansatz 1* oder *Stimulationsansatz 2* verwendet.

### 2.2.1.2 Ansetzen der Zellkultur

Die PBMC der ausgewählten Spender wurden nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank (- 80 °C) in einem Kugelbad/Schüttelwasserbad für 8 Minuten bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die verwendeten Zellen des jeweiligen Spenders in einem 50 ml Reagenzröhrchen pipettiert und unter ständiger, kreisförmiger Bewegung die CTL Waschflüssigkeit in aufsteigender Menge bis zum Erreichen eines Volumens von 40 ml hinzugegeben.

Anschließend wurden die Reagenzröhrchen für 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Das entstandene Zellpellet wurde durch mechanische Erschütterung und die Zugabe von 20 ml CTL Waschlösung erneut gelöst. Daraufhin wurden mit einer Pipette jeweils 15 µl der Zellsuspension der entsprechenden Spender entnommen und auf einen Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden 15 µl der *Live/Dead Cell Counting Dye* hinzugegeben. Die angefärbte Zellsuspension wurde darauffolgend in das Analysegerät eingefügt und anhand der *Live/Dead*-Zählungen die Zellen/ml bzw. die absolute Zellzahl berechnet. Analog erfolgte die Anfärbung am Anatomischen Institut mit 10 µl Trypanblaulösung und 10 µl der Zellsuspension.

Nach der erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 U/min wurden die Zellpellets vom Überstand getrennt und durch die Zugabe des BCM eine Zellsuspension mit  $4 \times 10^6$  Zellen/ml hergestellt. Das BCM ist zuvor im Kugelbad/Schüttelwasserbad langsam auf 37 °C erwärmt worden. Mit einer Pipette wurden anschließend  $16 \times 10^6$  Zellen (4 ml) des jeweiligen Spenders in mehrere T25-Zellkulturflaschen gegeben. Hierbei wurde für jeden Spender jeweils eine Zellkulturflasche pro Versuchstag und verwendeter Stimulationslösung angesetzt. Danach erfolgte die Zugabe entweder von *Stimulationsansatz 1* oder *Stimulationsansatz 2*.

Zusätzlich wurden Multiwell-Zellkulturplatten zur quantitativen Analyse der sezernierten Antikörper in den Kulturüberständen nach 11 Tagen *In-vitro*-Stimulation befüllt.

Die Zellkulturplatten und T25-Zellkulturflaschen wurden anschließend bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % für jeweils 3, 4, 5, 6, 7 oder 11 Tage inkubiert. Zwischen dem Auftauen der kryokonservierten PBMC und dem Platzieren der Zellkulturflaschen im Inkubator sind nie mehr als zwei Stunden vergangen.

Für die Zellspender, deren PBMC eine Woche nach der zweiten COVID-19-Impfung gewonnen wurden, wurde eine analoge Vorgehensweise gewählt. Da keine *In-vitro*-Stimulation der PBMC stattfinden sollte, wurden die Zellen direkt am Tag des FluoroSpot-Assays aus dem Gefrierschrank entnommen. Die weitere Vorgehensweise war wie oben beschrieben, allerdings wurden nach der zweiten Zentrifugation Zellsuspensionen mit  $3 \times 10^6$  Zellen/ml hergestellt. Das weitere Vorgehen wird im Abschnitt 2.2.2.2 *Durchführung des Assays* geschildert.

## 2.2.2 FluoroSpot-Assay

### 2.2.2.1 *Coating* der Mikrotiterplatten

Der *Coating*-Prozess erstreckt sich abhängig vom durchgeführten Assay über mehrere Tage und lässt sich in den *Coating*-Prozess der antigenspezifischen FluoroSpot-Platten – analog zu dem in der Literatur beschriebenen *Affinity-Tag-Coating*-Verfahren (Köppert et al., 2021) – und den der Pan-IgM/G/A/E bzw. Pan-IgG1/G2/G3/G4 unterteilen. Die Zeitangaben beziehen sich dabei auf die Durchführung eines Experimentes mit Pan-IgM/G/G1/G2/G3/G4/A/E und antigenspezifischen Assays.

#### 2.2.2.1.1 Antigen-spezifische Mikrotiterplatten

Tag 1:

Zur Vorbereitung des FluoroSpot-Assays wurde die Polyvinylidenfluorid-Membran der 96-Well-Mikrotiterplatten aktiviert. Hierfür wurde die Schutzlamelle unter der Mikrotiterplatte entfernt und 15 µl einer 70 %-igen Ethanollösung in jedes Well appliziert. Direkt danach wurden die Wells jeweils zwei Mal durch die Zugabe von 150 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und anschließendes Entleeren der Platte von überschüssigem Ethanol gereinigt und die Schutzlamelle wieder unter der Mikrotiterplatte angebracht. Darauf erfolgte die Applikation von 80 µl pro Well der zuvor angesetzten *Coating*-Lösung, welche den in PBS gelösten Anti-His-Tag-Antikörper enthielt. Dieser wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Anschließend wurden die Platten in eine feuchten Aufbewahrungsbox gegeben und über eine Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

## Tag 2:

Die inkubierte *Coating*-Lösung wurde durch Entleeren der Mikrotiterplatten entfernt und die Wells durch Zugabe von 150 µl PBS von überschüssigen Anti-His-Tag-Antikörpern gereinigt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 80 µl der Antigen-Lösungen.

Diese enthielten 10 µg/ml des Hämagglutinins (HA) von zwei Influenzasträngen (A/California/07/2009 rHA oder A/Texas/50/2012 rHA), des S-Proteins bzw. NCAP des SARS-CoV-2 oder das Protein EBNA1 des EBV bzw. MLC1 oder GlialCAM.

In die Wells der Negativkontrolle wurden 80 µl der Kontrolllösung, welche 1 µg/ml des Hexa-His-Moleküls, gelöst in PBS enthält, appliziert. Anschließend erfolgte die erneute Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C.

	Antigen	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6					
300.000 Zellen / Well	Hexa-His	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
	A/California/04/2009	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
	A/Texas/50/2012	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White
		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White

**Abb. 3:** Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen antigenspezifischen FluoroSpot-Assay

Vor Durchführung des Assays wurden die Reihen mit einem Anti-His-Tag-Antikörper und darauffolgend mit den verwendeten Antigenen (A/Texas/50/2012 rHA, A/California/04/2009 rHA, NCAP, S, EBNA1, MLC1 oder GlialCAM) wie von Köppert *et al.* (2021) beschrieben beschichtet. Die obersten zwei Reihen enthalten Hexa-His und dienen als Negativkontrollen. Anschließend wurden jeweils  $3 \times 10^5$  PBMC in die Wells in die für den jeweiligen Zellspender vorgesehenen Spalten pipettiert. (eigene Darstellung)

### 2.2.2.1.2 Pan-IgM/G/G1/G2/G3/G4/A/E-Mikrotiterplatten

Tag 2:

Analog zum oben beschriebenen Verfahren erfolgte die Aktivierung der Polyvinylidenfluorid-Membran mit einer 70 %-igen Ethanollösung und die anschließende Waschung der Mikrotiterplatten mit PBS. Anschließend wurden 80 µl einer zuvor angesetzten PBS-Lösung, welche 10 µg/ml *Goat Anti-Human Kappa-UNLB* und 10 µg/ml *Goat Anti-Human Lambda-UNLB* enthält, in jedes Well appliziert.

Zusammen mit den antigenspezifischen Mikrotiterplatten wurden die Platten in eine feuchten Aufbewahrungsbox gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

Zellen / Well	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6
30.000	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
15.000	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
7.500	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
3.750	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
1.875	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
937,5	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
468,75	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
234,375	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue

**Abb. 4:** Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen Pan-IgM/G/A/E<sup>+</sup> bzw. IgG1/G2/G3/G4 FluoroSpot-Assay

Vor Durchführung des Assays wurden alle Wells der Mikrotiterplatte mit *Goat Anti-Human Kappa-UNLB* und *Goat Anti-Human Lambda-UNLB* beschichtet. Anschließend wurde die oberste Reihe einer identischen Reihenverdünnungsplatte mit 240 µl der Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) und alle weiteren Wells mit 120 µl BCM befüllt. Durch die Übertragung von 120 µl der Zellsuspension in die darunter liegende Reihe wurde eine zweifache Verdünnungskurve angefertigt. Anschließend erfolgte die Übertragung von 100 µl in die mit 100 µl BCM vorbereiteten, korrespondierenden Wells auf der Assay-Platte. (eigene Darstellung)

### 2.2.2.2 Durchführung des Assays

Tag 3:

Vor der Durchführung des Assays wurde das BCM auf Raumtemperatur erwärmt. Nun wurden die vorbehandelten Mikrotiterplatten aus dem Kühlschrank entnommen und die *Coating*-Lösung durch Abschütten entfernt. Anschließend erfolgte die Reinigung der Wells durch die Hinzugabe von 150  $\mu$ l PBS, um nicht gebundene Antigen- bzw. Hexa-His-Moleküle zu entfernen. Nach Entleeren der Platten wurden diese mit 150  $\mu$ l BCM pro Well geblockt und bei Raumtemperatur unter dem Abzug des Laborarbeitsplatzes für mindestens eine Stunde aufbewahrt.

Die für den jeweiligen Versuchstag angesetzten T25-Zellkulturflaschen wurden aus dem Inkubator entnommen und die Flaschen mit der in ihnen enthaltenen Zelllösung gespült, um an den Wänden haftende Zellen zu lösen. Danach erfolgte die Übertragung in ein 15 ml fassendes, konisches Reagenzröhrchen und die Zentrifugation ebendieser für 10 Minuten bei 1200 U/min. Anschließend wurden 3 ml des flüssigen Zellkulturüberstandes mit einer Pipette für die Bestimmung der enthaltenen Antikörper entfernt (siehe 2.2.3 ELISA). Der entnommene Kulturüberstand wurde für 10 Minuten mit 1200 U/min zentrifugiert und bei - 20 °C bis zur Durchführung des ELISAs gelagert.

Nach der erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 U/min wurde das verbliebene Stimulationsmedium durch Dekantieren entfernt und erneut eine Zellsuspension durch mechanische Erschütterung des am Boden verbliebene Zellpellets und die Zugabe von 800  $\mu$ l BCM pro Reagenzröhrchen hergestellt. Nun wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension entnommen und in 40  $\mu$ l PBS gelöst (Verdünnung 1:5) und 15  $\mu$ l der verdünnten Lösung zusammen mit 15  $\mu$ l der *Live/Dead Cell Counting Dye* auf einen Objektträger aufgebracht. Analog wurden an der Universität Bonn 10  $\mu$ l der Zellsuspension entnommen und mit 10  $\mu$ l Trypanblaulösung versetzt. Hierbei erfolgte vorher keine Verdünnung mit PBS.

Nach Berechnung der Zellzahl wurden die Zellsuspensionen durch die Hinzugabe von BCM so verdünnt, dass jede Suspension  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  bzw.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml enthält. Für den Pan-IgM/G/A/E-FluoroSpot wurde eine Zellsuspension mit  $3 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt.

Im nächsten Schritt wurde die Blockierungslösung durch Abkippen aus den Wells der Mikrotiterplatten entfernt und 100  $\mu$ l BCM in jedes Well gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l der vorbereiteten Zellsuspensionen auf die vorbereiteten antigen-

spezifischen Platten, sodass sich in jedem Well  $1 \times 10^5$  Zellen (S) bzw.  $3 \times 10^5$  Zellen (Hexa-His, A/Texas/50/2012 rHA, A/California/04/2009 rHA, NCAP, EBNA1, GlialCAM, MLC1) befanden (siehe Abb. 3).

Für den Pan-IgM/G/G1/G2/G3/G4/A-Assay wurden in die oberste Reihe einer Reihenverdünnungsplatte jeweils 240  $\mu$ l der Zellsuspension mit  $3 \times 10^5$  Zellen/ml pipettiert und die restlichen Wells mit 120  $\mu$ l BCM befüllt. Anschließend wurde durch die Übertragung von 120  $\mu$ l der vorherigen Zellsuspension in die nächste absteigende Reihe eine zweifache Verdünnungsreihe erstellt. Die anschließende Übertragung von 100  $\mu$ l der verdünnten Zellsuspensionen in die mit 100  $\mu$ l BCM vorbereiteten, korrespondierenden Wells der Mikrotiterplatten erfolgte in aufsteigender Ordnung, von der niedrigsten Zellkonzentration (Reihe H) zur höchsten (Reihe A) (siehe Abb. 4). Wurde im Rahmen des Assays auch IgE bestimmt, so wurde eine Zelllösung mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Anschließend wurden die FluoroSpot-Assay-Platten für 17 Stunden bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % inkubiert.

Tag 4:

Nach der Inkubationszeit wurden die vorbereiteten Platten aus dem Zellkulturschrank entnommen und die Zellsuspensionen durch Abkippen entfernt. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit unsterilem PBS, sowie in einem zweiten Waschvorgang mit PBS-Tween gereinigt und nicht gebundene Antikörper sowie verbliebene Zellen entfernt.

Darauffolgend wurde in jedes Well der Pan-IgM/G/G1/G2/G3/G4/A/E und antigenspezifischen Platten 55  $\mu$ l Diluent B-Lösung mit den sekundären Detektionsantikörpern gegeben (siehe Tab. 10) und die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur, unter Ausschluss von Licht, inkubiert.

Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBS-Tween erfolgte die Zugabe von 55  $\mu$ l pro Well der tertiären Detektionsantikörper – gelöst in Diluent C (siehe Tab. 10) – bevor die Platten erneut bei Raumtemperatur in der Dunkelheit für eine Stunde inkubiert wurden.

Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit destilliertem Wasser, sowie ein zweiter Durchlauf mit der Vakuum-Technik. Für den zweiten Waschvorgang wurden zuvor die Schutzlamellen entfernt. Es schloss sich die Trocknung bei Raumtemperatur an, bevor die Platten mit dem Immunospot<sup>®</sup> S6 Universal M2 gescannt wurden.

**Tab. 10:** Sekundäre und tertiäre Detektionsantikörper-Lösungen

	Sekundäre Detektionsantikörper	Tertiäre Detektionsantikörper
<b>3 Color-FluoroSpot (IgM/G/A)</b>	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-Human IgM	-
	Goat Anti-Human IgG Fc, Multi-Species SP ads- HRP	Rhodamine (TRITC) AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-HRP DyLight <sup>®</sup> 405 AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-HRP
	Goat Anti-Human IgA-BIOT	PerCP Streptavidin
<b>4 Color-FluoroSpot (IgM/G/A/E)</b>	AffiniPure <sup>®</sup> Rabbit Anti-Human IgM, Fc5 $\mu$ fragment specific	DyLight <sup>®</sup> 405 AffiniPure <sup>™</sup> Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)
	Goat Anti-Human IgG Fc, Multi-Species SP ads- HRP	Rhodamine (TRITC) AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-HRP
	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-Human Serum IgA, $\alpha$ chain specific	-
	Mouse Anti-Human IgE Fc-BIOT	PerCP Streptavidin
<b>4 Color-FluoroSpot (IgG1/G2/G3/G4)</b>	Mouse Anti-Human IgG1 Hinge-HRP	Rhodamine (TRITC) AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-HRP
	Mouse Anti-Human IgG2 Fc-BIOT	PerCP Streptavidin
	Mouse Anti-Human IgG3 Hinge-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	-
	Mouse Anti-Human IgG4 pFc'-UNLB	DyLight <sup>®</sup> 405 AffiniPure <sup>®</sup> Goat Anti-Mouse IgG, Fc $\gamma$ subclass 3 specific

### 2.2.3 ELISA

#### 2.2.3.1 Antigen-spezifischer ELISA

##### 2.2.3.1.1 *Coating* der Platten

Tag 1:

Zur Vorbereitung der Quantifizierung der in den Kulturüberständen vorhandenen, antigen-spezifischen Antikörper, wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten einen Tag vor Durchführung des Assays mit den jeweiligen Antigenen beschichtet. Dazu wurden die Antigene in Carbonate Buffer gelöst (Antigenkonzentration 2  $\mu$ g/ml). Anschließend wurden in die vorgesehenen Wells der zu testenden Zellspender und die Wells der Negativkontrolle jeweils 80  $\mu$ l der Antigenlösung pipettiert.

Für die Immunglobulin-Standardkurve wurde eine IgG-Lösung bekannter Konzentration in PBS gelöst (Konzentration 200 ng/ml) und 200  $\mu$ l in die untersten zwei Wells in Spalte 1 pipettiert. Die verbliebenen Wells in Reihe G und H wurden jeweils mit 100  $\mu$ l PBS aufgefüllt und durch anschließendes Übertragen von 100  $\mu$ l der Immunglobulinlösung in

die nur mit PBS gefüllten Wells (links nach rechts) wurde eine zweifache Verdünnungskurve generiert (siehe Abb. 5). Anschließend wurden die Platten über Nacht in einer feuchten Aufbewahrungsbox gegeben und bei 4 °C inkubiert.

Verdünnung Proben	Donor 1		Donor 2		Donor 3		Donor 4		Donor 5		Donor 6		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1/2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	A
1/6	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	B
1/18	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	C
1/2	weitere 6 Donoren												D
1/6													E
1/18													F
IgG Standardkurve	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	G
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	H
IgG ng/ml	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	Kontrolle			

**Abb. 5:** Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen antigenspezifischen IgG-ELISA

Vor Durchführung des ELISAs wurde alle Wells der Mikrotiterplatte mit den verwendeten Antigenen (A/Texas/50/2012 rHA oder A/California/04/2009 rHA) beschichtet. Wells G1 und H1 wurden mit 200 µl einer IgG-Standardlösung (Konzentration 200 ng/ml) und die Wells G2-9 bzw. H2-9 mit 100 µl PBS befüllt. Anschließend erfolgte der Transfer von 100 µl von links nach rechts zur Anfertigung einer zweifachen Verdünnungskurve – die IgG Standardkurve. Nach einer nächtlichen Inkubationsperiode erfolgte die Zugabe von 150 µl der im Verhältnis 1:2 verdünnten Kulturüberstände in die für den jeweiligen Zellspender vorgesehenen Wells in Reihe A und D. Alle weiteren Wells wurden mit 100 µl ELISA-Blocking-Buffer befüllt. Darauf folgend erfolgte der Transfer von 50 µl reihenweise von Reihe A bis C bzw. D bis F, sodass eine dreifache Verdünnungsreihe entsteht. Anschließend erfolgten die Inkubation und der Nachweis der gebundenen Antikörper. (eigene Darstellung)

### 2.2.3.1.2 Durchführung des Assays

Tag 2:

Die vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden aus dem Kühlschrank entnommen und über dem Waschbecken entleert. Anschließend wurde die gesamte Platte mit 150 µl pro Well ELISA-Blocking-Buffer geblockt und für zwei Stunden in der Dunkelheit inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte erneut entleert und Reihe B-C, sowie Reihe E-H (siehe Abb. 5) mit 100 µl des ELISA-Blocking-Buffers befüllt.

Die Zellkulturüberstände wurden im Verhältnis 1:2 mit ELISA-Blocking Buffer verdünnt und 150 µl in die für den entsprechenden Probanden vorgesehenen Wells in Reihe A und D titriert. Anschließend wurden mit einer Transferpipette jeweils 50 µl in die darunter liegende Reihe transferiert, um eine dreifache Verdünnungsreihe zu erhalten und abschließend in Reihe C und F 50 µl der Lösung entfernt, sodass sich in jedem Well 100 µl der verdünnten Zellkulturüberstände befanden.

Nach einer erneuten zweistündigen Inkubationsperiode wurden die Platten in fünf Waschzyklen mit PBS gereinigt und 80 µl des Detektionsantikörpers – gelöst in ELISA-Blocking Buffer – dazugegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation für eine Stunde.

Nach einem erneuten Durchlaufen der Waschzyklen erfolgte die Zugabe von 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (blauer Farbumschlag) in jede Well. Die Farbreaktion wurde nach drei Minuten durch die Zugabe von 100 µl Salzsäure gestoppt (gelber Farbumschlag) und die Platten mit dem ELISA-Plattenlesegerät bei 450 nm ausgewertet.

### 2.2.3.2 Pan-IgG/E-ELISA

#### 2.2.3.2.1 *Coating* der Platten

Tag 1:

Die Mikrotiterplatten wurden einen Tag vor Durchführung des Assays mit den Coating-Antikörpern beschichtet. Zur Herstellung der Antikörperlösung wurden 1 µg/ml *Goat Anti-Human Kappa-UNLB* und 1 µg/ml *Goat Anti-Human Lambda-UNLB* in PBS gelöst und anschließend alle Wells der Mikrotiterplatte mit 80 µl der Antikörperlösung befüllt. Die Platten wurden in eine feuchte Aufbewahrungsbox gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Verdünnung Proben	Donor 1		Donor 2		Donor 3		Donor 4		Donor 5		Donor 6		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1/200	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	A
1/600	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	B
1/1.800	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	C
1/5.400	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	D
1/16.200	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	E
1/48.600	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	F
IgG Standardkurve	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	G
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	H
IgG ng/ml	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	Kontrolle			

**Abb. 6:** Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen Pan-IgG/E-ELISA

Vor Durchführung des ELISAs wurde alle Wells der Mikrotiterplatte mit *Goat Anti-Human-Kappa-UNLB* und *Goat Anti-Human Lambda-UNLB* beschichtet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl der im Verhältnis 1:200 verdünnten Kulturüberstände in die für den jeweiligen Zellspender vorgesehenen Wells in Reihe A. Alle weiteren Wells (Ausnahme G1 und H1) wurden mit 100 µl ELISA-Blocking-Buffer befüllt. Anschließend erfolgte der Transfer von 50 µl von Reihe A bis F, sodass eine dreifache Verdünnungsreihe entsteht. Wells G1 und H1 wurden mit 200 µl einer IgG-/IgE-Standardlösung (Konzentration 100 ng/ml) befüllt und durch den Transfer von 100 µl von links nach rechts eine zweifache Verdünnungskurve – die IgG/E-Standardkurve – angefertigt. Anschließend erfolgten die Inkubation und der Nachweis der gebundenen Antikörper. (eigene Darstellung)

#### 2.2.3.2.2 Durchführung des Assays

##### Tag 2:

Nach dem oben beschriebenen Blockierungsvorgang wurden die Wells in Reihe B-H mit 100 µl des ELISA-Blocking-Buffers befüllt, wobei die beiden linksseitig gelegenen Wells G1 und H1 ausgespart wurden. Anschließend wurden 200 µl der in ELISA-Blocking-Buffer gelösten IgG- bzw. IgE-Standardlösung (Konzentration 100 ng/ml) in die beiden ausgesparten Wells eingefüllt und durch den Transfer von 100 µl von links nach rechts die IgG/E-Standardkurve in Form einer zweifachen Verdünnungskurve generiert. Danach wurden 150 µl der im Verhältnis 1:200 verdünnten Zellkulturüberstände in die für den jeweiligen Spender vorgesehenen Wells in Reihe A gefüllt und durch den Transfer von 50

$\mu\text{l}$  in die darunter liegende Reihe eine dreifache Verdünnungskurve erzeugt (siehe Abb.6). In Reihe F wurden 50  $\mu\text{l}$  der Lösung entfernt, sodass sich in jedem Well 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Zellkulturüberstände befanden.

Der sich anschließende Inkubations-, Wasch- und Entwicklungsprozess verlief analog zu dem unter 2.2.3.1.2 *Durchführung des Assays* beschriebenen Prozederes.

## 2.4 Statistik

Zur Auswertung der FluoroSpot- und ELISA-Daten wurde die Software SpotStat™ (Version 1.6.4.0, Cellular Technology Limited, Shaker Heights, Ohio, USA) verwendet.

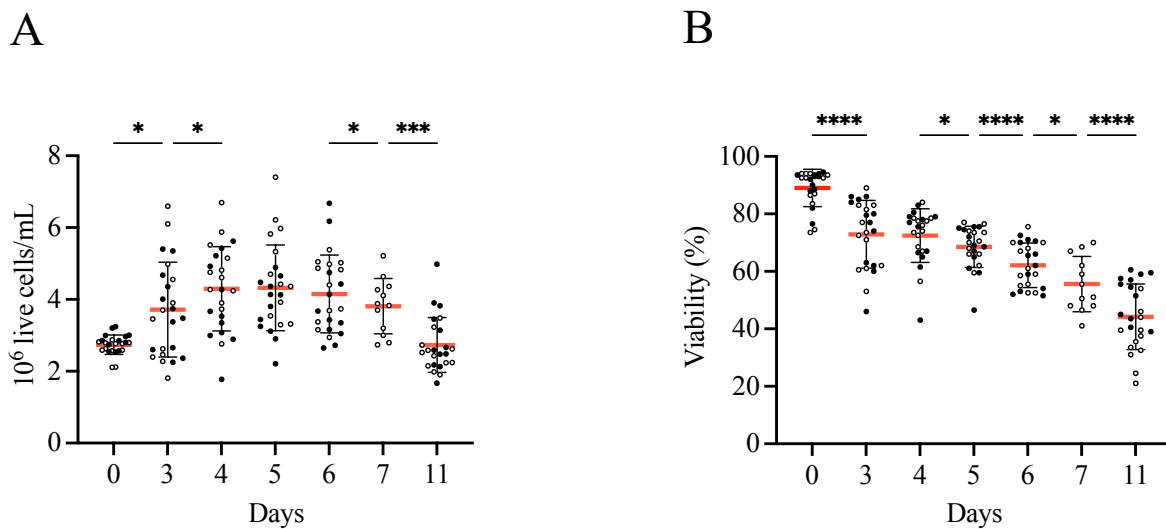
Für die Messung der optischen Dichten der ELISA-Platten wurde die Software SoftMax® Pro 7 (Version 7.1.0, Molecular Devices, San Jose, California, USA) verwendet.

Die statistische Varianzanalyse (ANOVA), der ungepaarte t-Test und die Erstellung der Schaubilder erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 10.5.2, San Diego, California, USA). Arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind als rote Querbalken und die Standardabweichung ( $\sigma$ ) als schwarze *Whiskers* angegeben. Die Signifikanzwerte werden wie folgt unterteilt und dargestellt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 *In-vitro*-Stimulation

Vor Ansetzen der Zellkultur, sowie zum Zeitpunkt der Assay-Durchführung, wurden die Anzahl der lebendigen Zellen im Kulturmedium, sowie der prozentuale Anteil ebendieser an der gemessenen Anzahl von lebendigen und apoptotischen Zellen bestimmt, sodass beide Zellkulturen an Tag 0 ähnliche Zellanzahlen ( $\bar{x} = 2,74 \times 10^6$  vitale Zellen/ml *Stimulationsansatz 1* bzw.  $2,63 \times 10^6$  vitale Zellen/ml *Stimulationsansatz 2*) und einen ähnlichen prozentualen Anteil vitaler Zellen ( $\bar{x} = 89,02\%$  *Stimulationsansatz 1* bzw.  $88,85\%$  *Stimulationsansatz 2*) aufwiesen. Die Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass nur die PBMC von 12 Probanden aus der untersuchten Kohorte ( $n = 24$ ) zeitgleich mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert wurden.

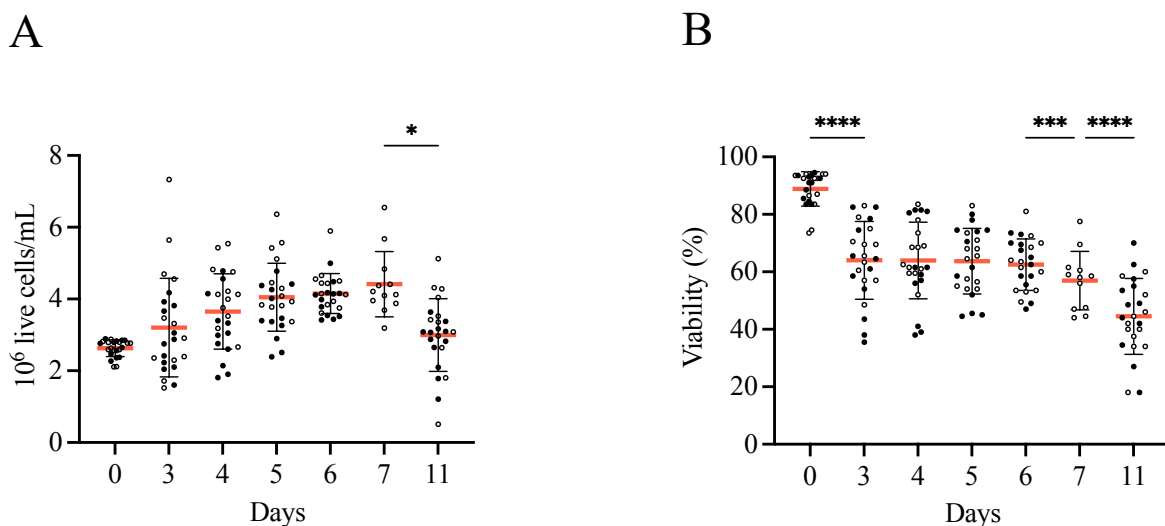


**Abb. 7:** *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2

Die PBMC von 24 Zellspendern wurden mit R848 + rIL-2 oder Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 stimuliert und zu Beginn der Zellkultur (Tag 0) und an Tag 3, 4, 5, 6 und 11 die Anzahl vitaler Zellen pro ml (**A**) sowie der prozentuale Anteil vitaler Zellen an der Gesamtanzahl der detektierten Zellen im Kulturmedium gemessen (**B**). Die als schwarze Kreise (o) dargestellten Zellspender ( $n = 12$ ) wurden parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert und außerdem an Tag 7 untersucht. Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung  $\sigma$  als *Whiskers* dargestellt.

\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$

Bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* konnte ein Anstieg der absoluten Zellanzahl bis auf durchschnittlich  $4,32 \times 10^6$  vitale Zellen/ml an Tag 5 mit einem sich anschließenden, signifikanten Abfall der Zellanzahl ab Tag 6 auf  $2,73 \times 10^6$  vitale Zellen/ml an Tag 11 gemessen werden (siehe Abb. 7 A). Zusätzlich fiel eine große Standardabweichung der Anzahl lebendiger Zellen/ml an Tag 3 auf ( $\sigma = 1,32$ ), was auf einen unterschiedlich starken Überlebens- und Differenzierungsreiz des Stimulationsansatzes auf die ruhenden B-Lymphozyten hinweist. Diese Beobachtung spiegelt sich auch im prozentualen Anteil vitaler Zellen im Kulturmedium wider ( $\sigma = 11,80$ ) (siehe Abb. 7 B). Hierbei fällt besonders ein annähernd gleichbleibender prozentualer Anteil lebendiger Zellen an Tag 3 ( $\bar{x} = 72,90$  %) und Tag 4 ( $\bar{x} = 72,46$  %) und ein sich anschließender, signifikanter Abfall auf einen durchschnittlichen Anteil lebendiger Zellen von 44,23 % an Tag 11 auf.



**Abb. 8:** *In-vitro*-Stimulation mit Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21

Die PBMC von 24 Zellspendern wurden mit R848 + rIL-2 oder Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 stimuliert und zu Beginn der Zellkultur (Tag 0) und an Tag 3, 4, 5, 6 und 11 die Anzahl vitaler Zellen pro ml (**A**) sowie der prozentuale Anteil vitaler Zellen an der Gesamtanzahl der detektierten Zellen im Kulturmedium gemessen (**B**). Die als schwarze Kreise (o) dargestellten Zellspender ( $n = 12$ ) wurden parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert und außerdem an Tag 7 untersucht. Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung  $\sigma$  als *Whiskers* dargestellt.

\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$

Dagegen konnte bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* – gemessen an der absoluten Zellzahl – ein langsamerer Anstieg der Zellanzahl im Kulturmedium beobachtet werden.

Unter diesem Stimulationsansatz wurde die maximale Zellanzahl erst an Tag 7 mit einem  $\bar{x}$  von  $4,42 \times 10^6$  vitalen Zellen/ml erreicht. Hierbei fiel besonders eine Plateauphase von Tag 3 bis einschließlich Tag 6 auf, in der der prozentuale Anteil lebendiger Zellen nur gering zwischen 62,50 % und 64,04 % schwankte. Anschließend sank der prozentuale Anteil lebendiger Zellen sowie die gemessene Zellanzahl analog zu den bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* gemachten Beobachtungen bis Tag 11 auf durchschnittlich 44,50 % (Abb. 8 B). Die Gesamtanzahl vitaler Zellen pro Milliliter war unter Verwendung von *Stimulationsansatz 2* im Zeitraum zwischen Tag 3 und Tag 5 kleiner als bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1*. An Tag 7 ließ sich mit  $4,42 \times 10^6$  Zellen/ml bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* eine höhere Anzahl vitaler Zellen als im gesamten Untersuchungszeitraum bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* messen.

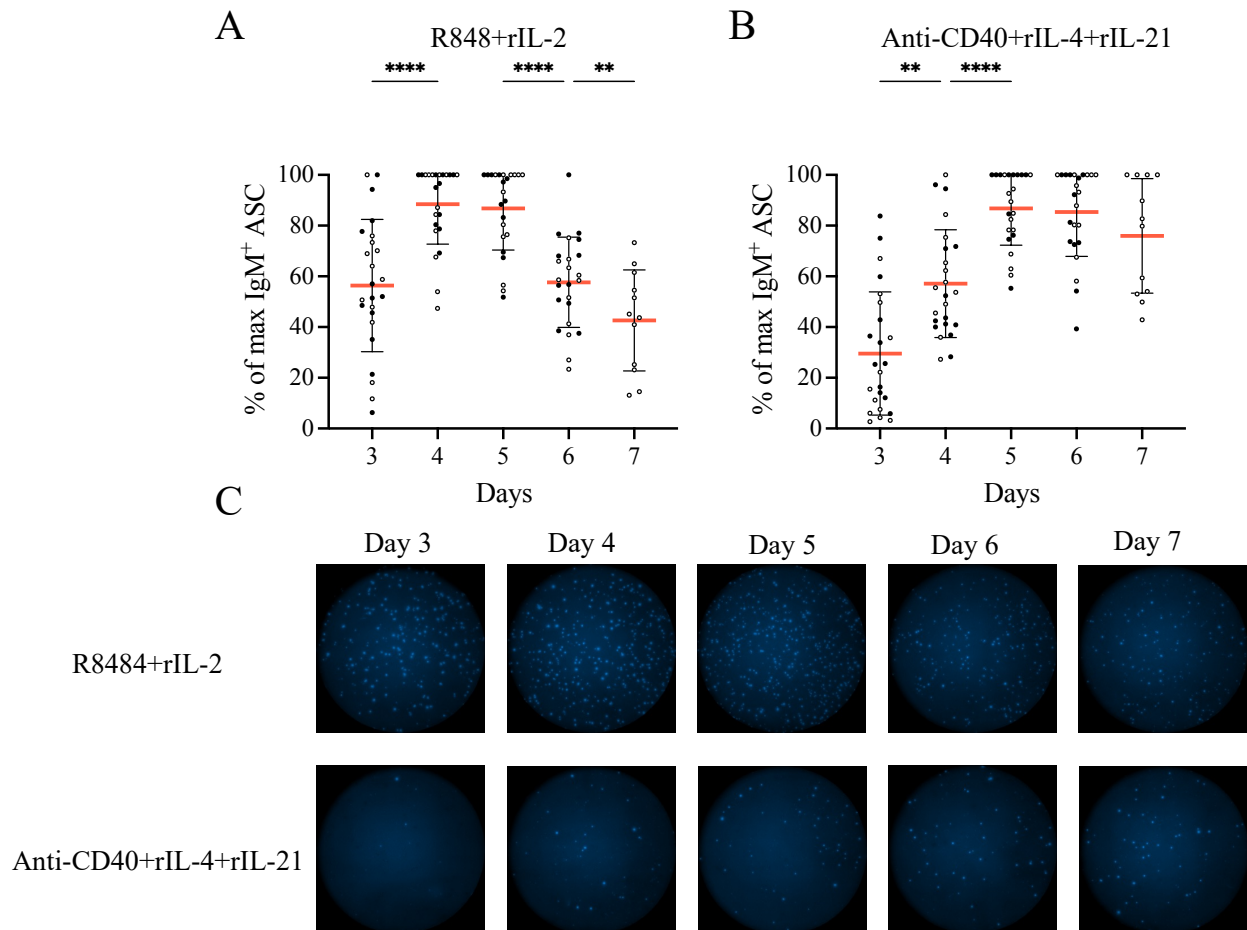
## 3.2 Immunglobulinsekretion

### 3.2.1 IgM

Bei Betrachtung der in *Abb. 9* dargestellten, detektierten IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ im FluoroSpot-Assay fällt ein besonders früher Gipfel der Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ – gemessen an der maximalen Anzahl detektierter IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ – an Tag 4 und Tag 5 bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* auf. Hierbei ist aber zu beachten, dass – obwohl an diesen Tagen die Mehrzahl der Spender das Maximum an IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ erreicht – bei einem der Spender erst an Tag 6 die maximalen Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nachgewiesen werden konnte. Bei einem weiteren Probanden konnte sowohl an Tag 3 als auch Tag 4 die maximale Anzahl an IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ detektiert werden (siehe *Abb. 9 A*). Dieser wies auch den geringsten Abfall IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bis einschließlich Tag 7 (73,33 %) auf.

Im Vergleich dazu erreichten IgM<sup>+</sup>-sezernierende ASZ bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* erst an Tag 5 und Tag 6 den höchsten Anteil IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ (siehe *Abb. 9 B*). Während einer der Spender bereits an Tag 4 das Maximum erreichte, konnte bei vier Probanden erst an Tag 7 die maximale Anzahl von IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ gemessen werden. Insgesamt lässt sich somit eine Rechtsverschiebung der gemessenen maximalen Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ unter Verwendung von *Stimulationsansatz 2* feststellen. Die absolute Anzahl von IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ war bei Verwendung von

*Stimulationsansatz 2* geringer als bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* (Daten nicht dargestellt).



**Abb. 9:** Vergleich der Kinetik der IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ

Darstellung des prozentualen Anteils der an den jeweiligen Tagen im FluoroSpot-Assay detektierten IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ – gemessen an der maximal detektierten Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ für den jeweiligen Zellspender (n = 24) – bei Verwendung von R848 + rIL-2 (**A**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B**). Die als schwarze Kreise (o) dargestellten Zellspender (n = 12) wurden parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert und außerdem an Tag 7 untersucht. Abbildung (**C**) zeigt repräsentative Aufnahmen von Wells eines Zellspenders an verschiedenen Tagen nach Ansetzen der Zellkultur. Jedes dargestellte Well mit einem Zellinput von ~ 7500 Zellen. Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung  $\sigma$  als *Whiskers* dargestellt. Fluorochrom: DyLight<sup>®</sup> 405, Exzitationswellenlänge: 400 nm, Emissionswellenlänge: 421 nm, Lichtquelle: 405 nm, Filter: 440 nm, Vergrößerung: 2,03

\*\* p < 0,005, \*\*\*\* p < 0,00005

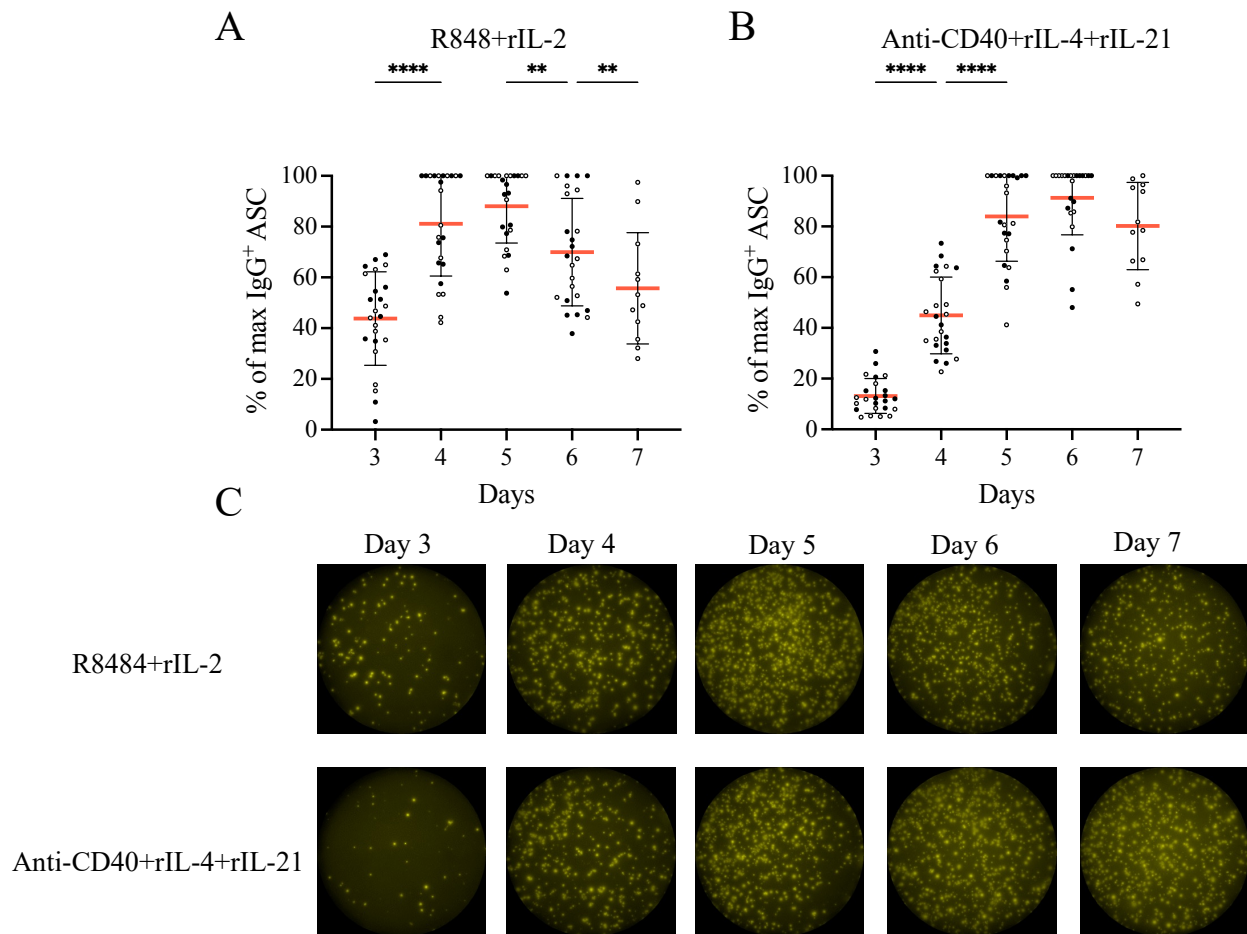
Diese Beobachtung fällt besonders beim Betrachten der repräsentativen Wells in *Abb. 9 C* auf, welche beispielhaft die FluoroSpot-Ergebnisse eines Zellspenders im zeitlichen Verlauf und unter Gegenüberstellung der beiden verwendeten Stimulationsansätze zeigt. Die deutlich geringere Anzahl von IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ pro Zellinput im gesamten Zeitverlauf bei Stimulation der Zellen mit *Stimulationsansatz 2* ist hierbei gut zu erkennen.

### 3.2.2 IgG

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass im Vergleich zu IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ, der prozentuale Anteil der IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ am ersten Tag der Versuchsdurchführung – unabhängig vom verwendeten Stimulationsansatz – deutlich geringer war ( $\bar{x} = 43,80\%$  *Stimulationsansatz 1* bzw.  $\bar{x} = 13,14\%$  *Stimulationsansatz 2*) (siehe *Abb. 10*).

Analog zu den Ergebnissen für die IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ, konnte für 10 von 24 Zellspender bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* die größte Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 5 detektiert werden ( $\bar{x} = 88,03\%$ ), wohingegen bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* die bereits beschriebene Rechtsverschiebung hin zu Tag 6 beobachtet werden konnte ( $\bar{x} = 91,31\%$ ). Im Vergleich zur IgM<sup>+</sup>-Sekretion erreichte unter *Stimulationsansatz 1* keiner der Spender seine höchste Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 3. Bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* erreichten 14 von 24 Spender die maximale Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ an Tag 6.

Neben der Durchführung des FluoroSpot-Assays wurden die Zellkulturüberstände – bei der parallelen Stimulation mit beiden Stimulationsansätzen – auf die am jeweiligen Untersuchungstag enthaltene Menge an IgG untersucht. Da diese während der gesamten Kultivierungsdauer durch die sich im Medium befindenden – zu Plasmablasten differenzierten – B-Zellen sezerniert wurden, erfolgte eine Messung der kumulierten IgG-Menge, die von der Anzahl der ASZ und deren Sekretionsleistung abhängig ist.



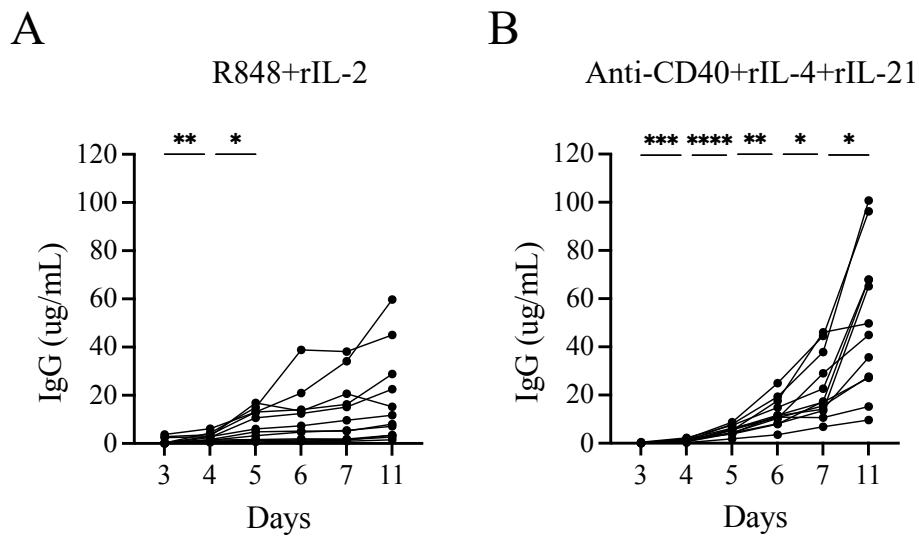
**Abb. 10:** Vergleich der Kinetik der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ

Darstellung des prozentualen Anteils der an den jeweiligen Tagen im FluoroSpot-Assay detektierten IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ – gemessen an der maximal detektierten Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ für den jeweiligen Zellspender (n = 24) – bei Verwendung von R848 + rIL-2 (**A**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B**). Die als schwarze Kreise (o) dargestellten Zellspender (n = 12) wurden parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert und außerdem an Tag 7 untersucht. Abbildung (**C**) zeigt repräsentative Aufnahmen von Wells eines Zellspenders an verschiedenen Tagen nach Ansetzen der Zellkultur. Jedes dargestellte Well mit einem Zellinput von ~ 7500 Zellen. Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung  $\sigma$  als *Whiskers* dargestellt. Fluorochrom: TRITC, Exzitationswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm, Lichtquelle: 570 nm, Filter: 600 nm, Vergrößerung: 2,03

\*\* p < 0,005, \*\*\*\* p < 0,00005

Bei der Untersuchung der Zellkulturüberstände konnte bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* bereits nach drei Tagen Inkubationszeit bei drei Zellspendern mehr als 2 µg/ml IgG nachgewiesen werden. Alle drei Subjekte erreichten ihre größte Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ im FluoroSpot-Assay allerdings erst an Tag 5. Nur bei einem der

erwähnten Zellspender konnte mit 59,77 µg/ml auch an Tag 11 die größte Menge IgG in den Kulturüberständen nachgewiesen werden. Der Großteil der untersuchten Zellspender zeigte ab Tag 5 eine nicht signifikante Zunahme der gemessenen Antikörperkonzentration. Die beiden Zellspender mit der höchsten IgG-Konzentration waren auch diejenigen mit den meisten detektierten IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ an Tag 7 (siehe Abb. 11 A).



**Abb. 11:** IgG-Konzentration in den Zellkulturüberständen im zeitlichen Verlauf

In den jeweiligen Zellkulturüberständen der Spender wurden mit dem ELISA die im Medium enthaltenen Antikörper vom Typ IgG gemessen. Dargestellt ist die in den Zellkulturüberständen der jeweiligen Zellspender (n = 12) gemessene IgG-Menge bei *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2 (**A**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B**).

\* p < 0,05, \*\* p < 0,005, \*\*\* p < 0,0005, \*\*\*\* p < 0,00005

Anmerkung zu (**B**): Für einen Zellspender konnte an Tag 11 kein IgG in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden.

Bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* fiel ein ausgeprägter Anstieg der gemessenen IgG-Konzentrationen auf (siehe Abb. 11 B), sodass an jedem der Untersuchungstage eine signifikante Zunahme der gemessenen Antikörpermenge im Zellmedium detektiert werden konnte. Während an Tag 3 und Tag 4 die sezernierte Menge IgG kaum nachgewiesen werden konnte, stieg die Sekretionsleistung ab Tag 5 stärker als bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* an. Die durchschnittlich gemessene IgG-Konzentration war von Tag 6 bis einschließlich Tag 11 höher bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* und erreichte an Tag 11 ihr Maximum mit einem über zweifach höheren  $\bar{x}$  von 50,68 µg/ml.

Diese Beobachtungen sind im Einklang mit den Ergebnissen der korrespondierenden FluoroSpot-Assays, welche einen insgesamt größeren prozentualen Anteil IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* an den Tagen 6 und 7 zeigten. Die beiden Zellspender mit der höchsten gemessenen Menge IgG in den Zellkulturüberständen waren auch diejenigen mit den meisten detektierten IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ an Tag 7. Einer dieser Spender sticht sowohl bei Betrachtung der absoluten Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 7 (Daten nicht dargestellt), als auch der Menge an IgG in den Kulturüberständen an Tag 11 bei Stimulation mit beiden *In-vitro*-Stimulationsansätzen durch eine große Anzahl detektierter ASZ und hohe IgG-Konzentration in den Kulturüberständen hervor.

### 3.2.3 IgG-Subklassen

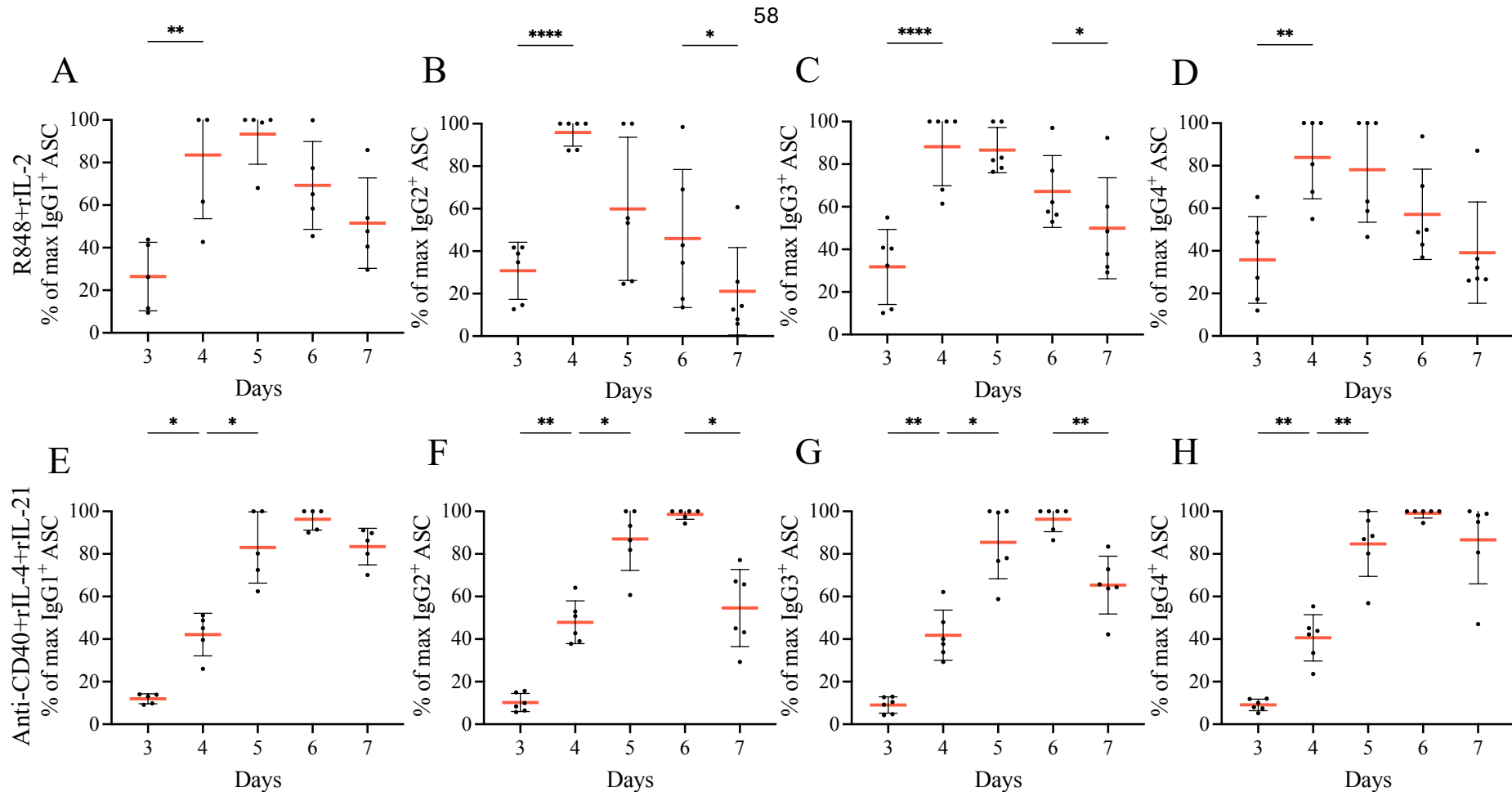
Für sechs Zellspender wurde – bei der parallelen Verwendung beider Stimulationsansätze – neben der Bestimmung von IgM/G/A/E auch eine Aufschlüsselung der IgG-Subklassen in IgG1/G2/G3/G4 durchgeführt.

Da bei einem der untersuchten Zellspender – unabhängig vom verwendeten Stimulationsansatz – keine IgG1-sezernierenden ASZ an zwei der untersuchten Tage nachgewiesen werden konnten, wurde dieser aus der IgG1-Kohorte ausgeschlossen.

Bei allen IgG-Subklassen fiel bei Stimulation der Zellen mit *Stimulationsansatz 2* die auch für die Pan-IgG beobachtete Rechtsverschiebung von Tag 4 bzw. Tag 5 in Richtung Tag 5 und Tag 6 auf (siehe Abb. 12). Diese wird auch durch den für alle Subklassen kleineren  $\bar{x}$  von < 11,98 % an Tag 3 untermauert (*Stimulationsansatz 1*  $\bar{x}$  = 26,46 - 35,75 %). Bei der Mehrheit der untersuchten Spender konnte bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* an Tag 6 die maximale Anzahl IgG1/G2/G3/G4-sezernierender ASZ detektiert werden. Zusätzlich zeigten an diesem Tag alle Subklassen die kleinste  $\sigma$  und ein  $\bar{x}$  von 96,30 - 99,09 %.

Bei der Verwendung von *Stimulationsansatz 1* konnte an Tag 5 der größte prozentuale Anteil IgG1-sezernierender ASZ nachgewiesen werden ( $\bar{x}$  = 93,37 %), wohingegen für die weiteren Subklassen der höchste  $\bar{x}$  an Tag 4 ermittelt wurde. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die Werte bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* eine größere interindividuelle Schwankung aufwiesen. So konnte beispielhaft bei Betrachtung der IgG2-sezernierenden ASZ an Tag 5 für zwei der Zellspender die maximale Anzahl IgG2-

sezernierender ASZ nachgewiesen werden, während bei zwei weiteren Spendern ein Abfall der Anzahl IgG2-sezernierender ASZ auf 24,63 % bzw. 25,87 % gemessen wurde (siehe Abb. 12 B).



**Abb. 12:** Vergleich der Kinetik der IgG-Subklassen-sezernierenden ASZ

Darstellung des prozentualen Anteils der an den jeweiligen Tagen im FluoroSpot-Assay detektierten IgG1/G2/G3/G4-sezernierenden ASZ – gemessen an der maximal detektierten Anzahl IgG1/G2/G3/G4-sezernierender ASZ für den jeweiligen Zellspender (n = 6) – bei Verwendung von R848 + rIL-2 (**A-D**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**E-H**). Aufschlüsselung der verschiedenen Subklassen: IgG1 (**A** und **E**), IgG2 (**B** und **F**), IgG3 (**C** und **G**) und IgG4 (**D** und **H**). Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung als *Whiskers* dargestellt. \* p < 0,05, \*\* p < 0,005, \*\*\*\* p < 0,00005

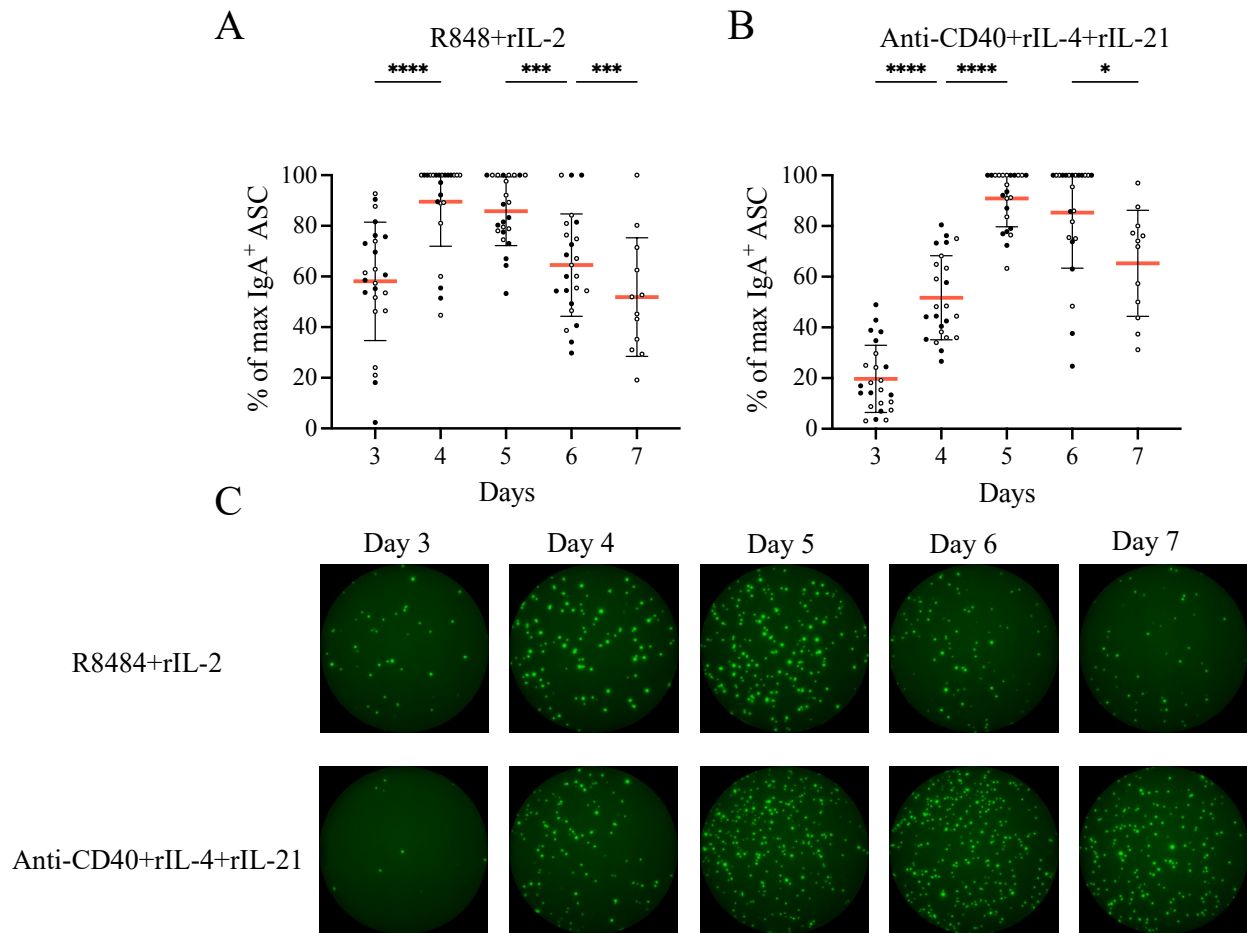
Anmerkung zu (**A**) und (**E**): Einer der Zellspender wurde ausgeschlossen, da kein IgG1 nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.4 IgA

Die für IgA gemachten Beobachtungen reihen sich in die für die anderen Antikörperklassen gewonnenen Erkenntnisse ein. So erreichten bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* 14 der 24 untersuchten Zellspender ihre maximale Anzahl IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bereits an Tag 4 und sechs weitere diese an Tag 5 (siehe Abb. 13 A). Einer der Zellspender wies an beiden Tagen die für ihn maximale Anzahl IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ auf, sodass dieser Zellspender an beiden Tagen mit 100 % aufgeführt wird. Der dargestellte  $\bar{x}$  von 89,58 % an Tag 4 verdeutlicht, dass – auch wenn nicht bei allen Zellspendern die maximale Anzahl IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ detektiert werden konnte – dennoch in ihrer Gesamtheit der höchste prozentuale Anteil IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an diesem Tag gemessen wurde.

Drei der untersuchten Spender erreichten ihr Maximum erst an Tag 6, während für einige Donoren ein Abfall der gemessenen IgA<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ auf bis zu 19,10 % an Tag 7 beobachtet wurde. Hierbei ist die Ausprägung des Abfalls des prozentualen Anteils IgA<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ unabhängig davon, ob die untersuchten Spender ihr Maximum bereits an Tag 4 oder erst später erreichten.

Im Vergleich zu der mit *Stimulationsansatz 1* zur Differenzierung angeregten Kohorte – bei der ein Zellspender bereits 92,73 % seiner maximalen IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 3 erreichte – konnte für keinen der mit *Stimulationsansatz 2* zur Differenzierung angeregten Zellspender ein Anteil IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ von mehr als 49 % am ersten Untersuchungstag ( $\bar{x}$  = 19,69 %) nachgewiesen werden (siehe Abb. 13 B). Auch zeigte sich erneut die Rechtsverschiebung, wobei die Mehrzahl der Spender – wie bei den anderen untersuchten Antikörperklassen – ihr Maximum an Tag 6 erreichten. Bei keinem der Zellspender konnte bei *In-vitro*-Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* ein Wert von 100 % über mehr als einen Tag detektiert werden.



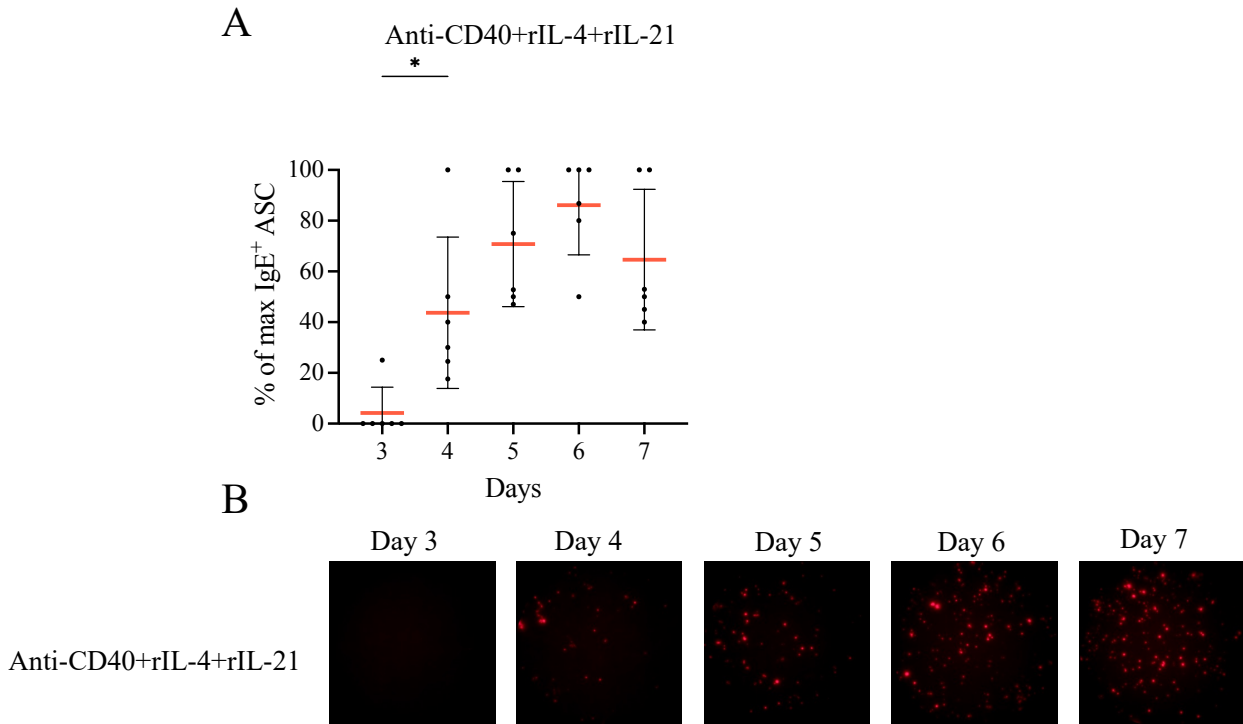
**Abb. 13:** Vergleich der Kinetik der IgA<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ

Darstellung des prozentualen Anteils der an den jeweiligen Tagen im FluoroSpot-Assay detektierten IgA<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ – gemessen an der maximal detektierten Anzahl IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ für den jeweiligen Zellspender (n = 24) – bei Verwendung von R848 + rIL-2 (**A**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B**). Die als schwarze Kreise (o) dargestellten Zellspender (n = 12) wurden parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert und außerdem an Tag 7 untersucht. Abbildung (**C**) zeigt repräsentative Aufnahmen von Wells eines Zellspenders an verschiedenen Tagen nach Ansetzen der Zellkultur. Jede dargestellte Well mit einem Zellinput von ~ 7500 Zellen. Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung  $\sigma$  als *Whiskers* dargestellt. Fluorochrom: Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, Exzitationswellenlänge: 490 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm, Lichtquelle: 480 nm, Filter: 520 nm, Vergrößerung: 2,03

\* p < 0,05, \*\*\* p < 0,0005, \*\*\*\* p < 0,00005

### 3.2.5 IgE

Bei den mit *Stimulationsansatz 1* zur Differenzierung angeregten PBMC konnten im gesamten Beobachtungszeitraum keine IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).



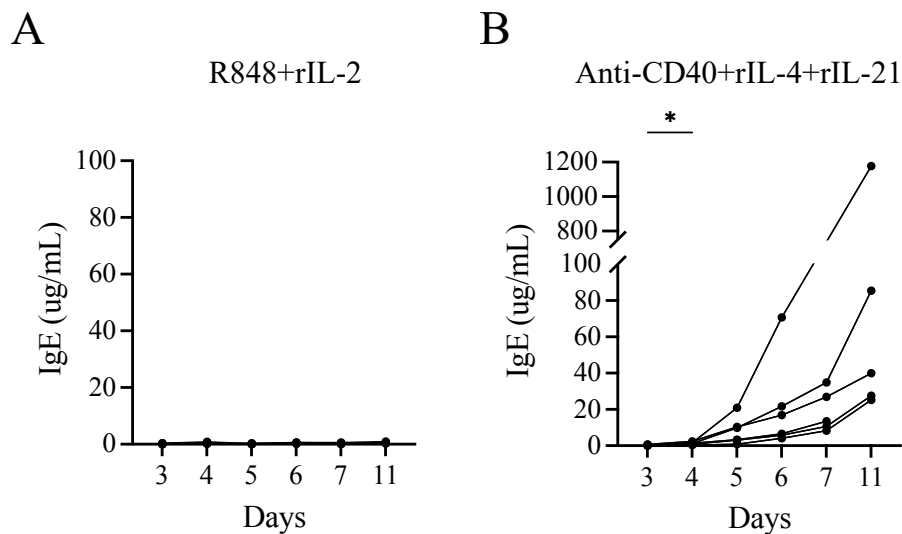
**Abb. 14:** Kinetik der IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ bei *In-vitro*-Stimulation mit Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21

Darstellung des prozentualen Anteils der an den jeweiligen Tagen im FluoroSpot-Assay detektierten IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ – gemessen an der maximal detektierten Anzahl IgE<sup>+</sup>-sezernierender ASZ für den jeweiligen Zellspender ( $n = 6$ ) – bei Verwendung von Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**A**). Abbildung (**B**) zeigt repräsentative Aufnahmen von Wells eines Zellspenders an verschiedenen Tagen nach Ansetzen der Zellkultur. Jedes dargestellte Well mit einem Zellinput von  $5 \times 10^4$  Zellen. Bei der Verwendung von R848 + rIL-2 konnten keine IgE-sezernierenden ASZ detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken und die Standardabweichung  $\sigma$  als *Whiskers* dargestellt. Fluorochrom: PerCP, Exzitationswellenlänge: 482 nm, Emissionswellenlänge: 675 nm, Lichtquelle: 480 nm, Filter: 690 nm, Vergrößerung: 2,03

\*  $p < 0,05$

Ausschließlich bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* konnten IgE<sup>+</sup>-sezernierende ASZ bei allen untersuchten Zellspendern detektiert werden. Zwei erreichten ihre maximale Anzahl IgE<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 5 ( $\bar{x}$  = 70,81 %), einer erreicht diese bereits an Tag 4 und ein Spender erst an Tag 7. Einer der untersuchten Subjekte erreichte an Tag 5 seine maximale Anzahl IgE<sup>+</sup>-sezernierender ASZ und ist bis einschließlich Tag 7 bei 100 % notiert (siehe Abb. 14 A). Insgesamt konnte der höchste  $\bar{x}$  mit 86,13 % an Tag 6 gemessen werden. An Tag 3 gelang bei fünf von sechs Spendern kein Nachweis von IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ, jedoch bei allen untersuchten Individuen am darauffolgenden Tag. Diese Beobachtung wird durch die abgebildeten Wells eines Spenders verdeutlicht (siehe Abb. 14 B). Bemerkenswert ist, dass bei einer höheren Zellanzahl pro Well als bei den anderen, in dieser Arbeit abgebildeten, repräsentativen Wells, an Tag 3 keine IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ detektiert werden konnten. Bis hin zu Tag 7 ist ein starker Anstieg der Anzahl fluoreszierender *Spots* ersichtlich. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass IgE<sup>+</sup>-sezernierende ASZ einen längeren Stimulationszeitraum benötigen oder während der *In-vitro*-Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* die CSR durchlaufen wird.

Die Zellkulturstände wurden – wie oben beschrieben – auch auf IgE untersucht. Die hierbei gewonnenen Daten untermauern die im FluoroSpot-Assay gemachten Beobachtungen. So konnten bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* während der gesamten Stimulations- und Kultivierungsdauer keine Antikörper vom Typ IgE im Kulturmedium nachgewiesen werden (siehe Abb. 15 A). Dagegen sezernierten die Zellen bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* bis einschließlich Tag 11 durchschnittlich 271,10 µg/ml IgE ins Kulturmedium. An Tag 3 und Tag 4 konnten nur sehr geringe IgE-Konzentrationen nachgewiesen werden, was mit dem initial fehlenden Nachweis IgE<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bei fünf der sechs untersuchten Spender im Einklang steht. Der oben beschriebene Zellspender, der im FluoroSpot-Assay bereits an Tag 4 seine maximale Anzahl IgE<sup>+</sup>-sezernierender ASZ erreichte, ist auch der Donor, bei dem an Tag 4 mit 2,35 µg/ml die höchste Konzentration von IgE in den Kulturüberständen gemessen werden konnte.

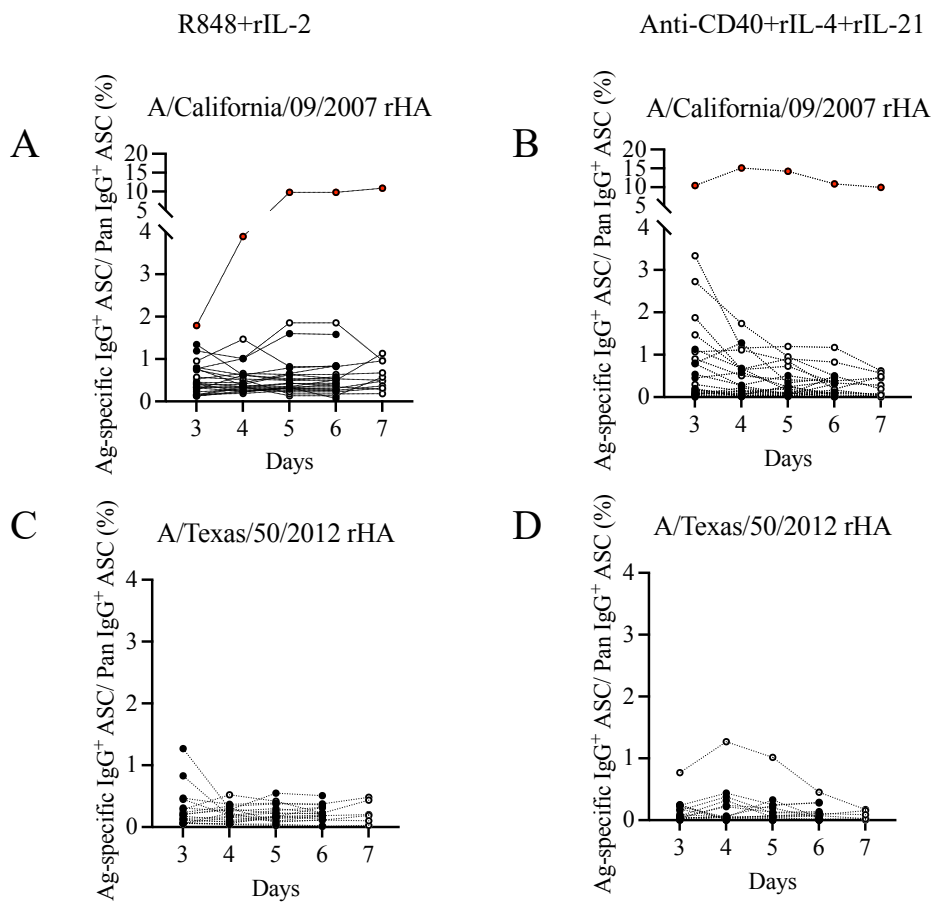


**Abb. 15:** IgE-Konzentration in den Zellkulturüberständen im zeitlichen Verlauf

An Tag 3, 4, 5, 6, 7 und 11 nach Ansetzen der Zellkultur wurden die Zellkulturüberstände der parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimulierten Zellspender gesammelt und mittels ELISA die im Medium enthaltenen, im Verlauf der Stimulation sezernierten, Antikörper vom Typ IgE gemessen. Dargestellt ist die in den Zellkulturüberständen der jeweiligen Zellspender (n = 6) gemessene IgE-Menge bei *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2 (**A**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B**). Analog zur fehlenden Detektion von IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ im FluoroSpot-Assay konnte im gesamten Untersuchungszeitraum auch in den Zellkulturüberständen bei Verwendung von R848 + rIL-2 kein IgE nachgewiesen werden. \* p < 0,05

### 3.2.6 Antigenreaktive IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ

Neben der Messung der Gesamtmenge an IgM/G/A/E<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ, wurde die Anzahl antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ, deren Immunglobuline sich gegen Epitope des HA von zwei Influenzasträngen richten, im zeitlichen Verlauf evaluiert. Da unter idealen Bedingungen der Anteil von B-Gedächtniszellen, deren Antigenpezifität sich gegen ein bestimmtes Antigen richtet, unabhängig von der *In-vitro*-Stimulationsdauer bzw. dem Untersuchungstag ist – und damit unverändert bleiben sollte –, wird die Anzahl der detektieren, antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ in Relation zur Gesamtanzahl der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ dargestellt. Wie in *Abb. 16* ersichtlich, war der Anteil von IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ, deren Spezifität gegen das HA des Influenzavirus A/Texas/50/2012 gerichtet ist, weitaus geringer als der gegen A/California/09/2007 rHA.



**Abb. 16:** Vergleich des Anteils antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an der Gesamtheit der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ

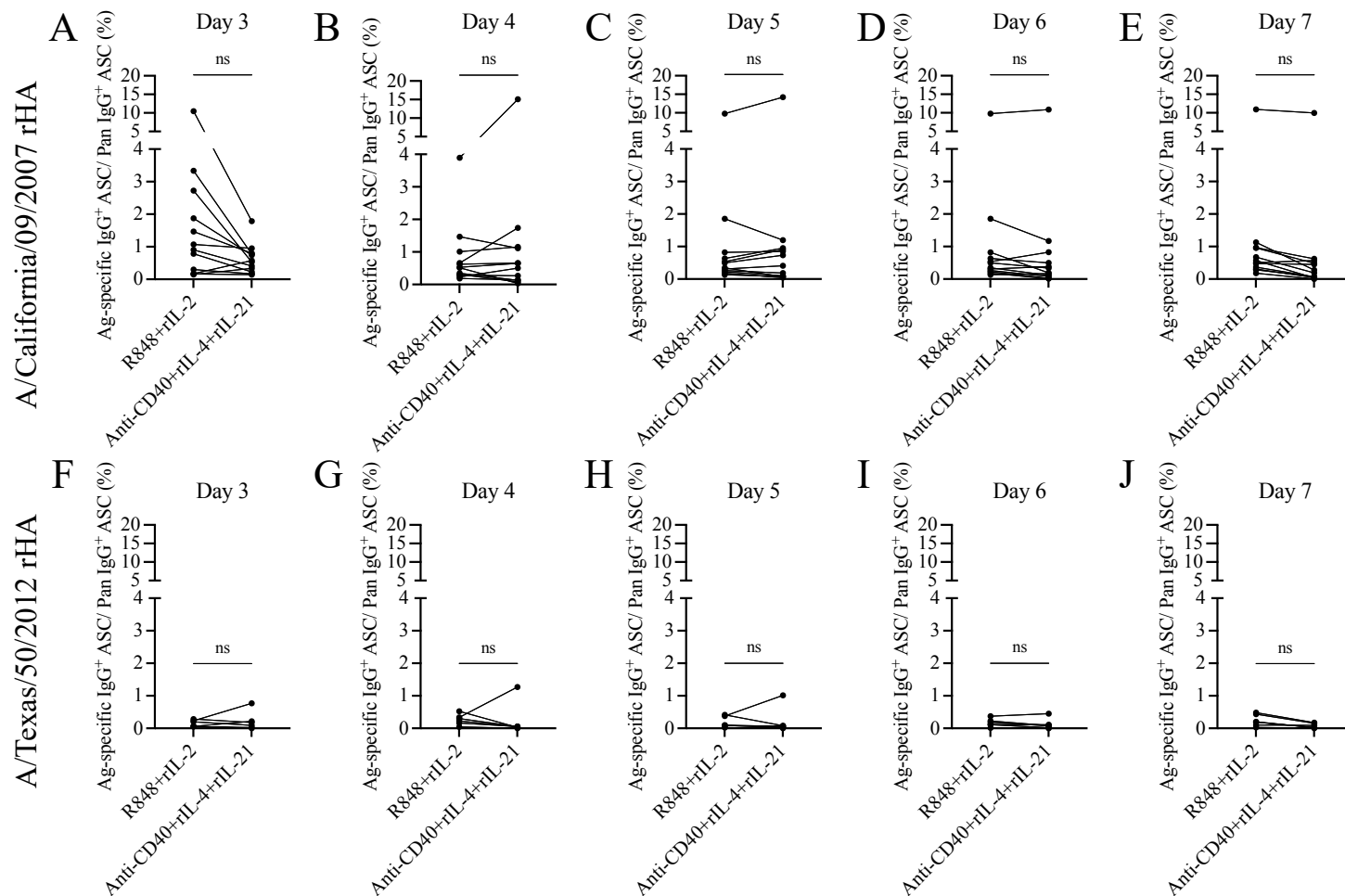
Darstellung der an den jeweiligen Tagen im FluoroSpot-Assay detektierten antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ bei einem Zellinput von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well im Verhältnis zur absoluten Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ in Prozent. Die Antigenreaktivität wurde gegenüber den Influenzaantigenen A/California/07/2009 rHA ( $n=24$ ) (**A** und **B**) und A/Texas/50/2012 rHA ( $n = 18$ ) (**C** und **D**) bei Verwendung von R848 + rIL-2 (**A** und **C**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B** und **D**) getestet. Die als schwarze Kreise (o) dargestellten Zellspender ( $n = 12$ ) wurden parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimuliert und außerdem an Tag 7 untersucht. Die rot gefärbten Punkte kennzeichnen die Ergebnisse von einem dieser parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimulierten Zellspender mit einem hohen prozentualen Anteil an antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ.

Diese Beobachtung war unabhängig vom gewählten Stimulationsmedium; bei allen untersuchten PBMC konnte – unabhängig vom evaluierten Antigen – kein signifikanter Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen der antigenreaktiven ASZ für jeden der untersuchten Tage festgestellt werden.

Bei *In-vitro*-Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* fiel eine Abnahme des prozentualen Anteils antigenreaktiver ASZ deren Spezifität gegen das HA von A/California/09/2007 gerichtet ist an Tag 3 und Tag 4 auf. Dieser war besonders bei Zellspendern erkennbar, die an Tag 3 einen hohen prozentualen Anteil antigenreaktiver ASZ aufwiesen. Ab Tag 4 unterlag der prozentuale Anteil antigenreaktiver ASZ an der Gesamtheit der gemessenen IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ nur geringen, weiterhin nicht signifikanten Schwankungen.

Bei Betrachtung der Antigenreaktivität gegenüber dem HA von A/Texas/50/2012 (Abb. 16 C und D) waren diese Schwankungen geringer ausgeprägt, wobei ein Zellspender durch seinen hohen Anteil antigenreaktiver ASZ und einen initialen Anstieg mit darauffolgendem Abfall des prozentualen Anteils an der Gesamtheit der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* hervorstach.

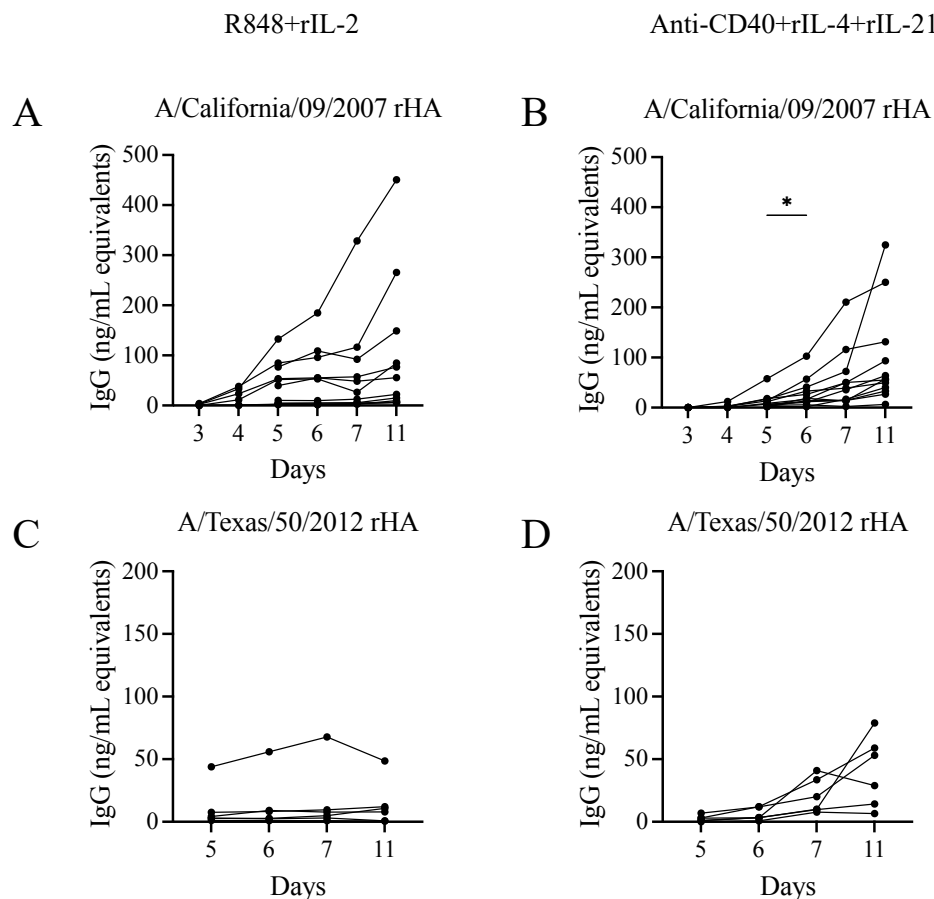
Der rot dargestellte Zellspender wies einen hohen prozentualen Anteil antigenreaktiver ASZ gegenüber A/California/09/2007 rHA auf (siehe Abb. 16 A und B). Mit einem Anteil von 9,97 - 15,09 % konnte bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* eine geringere prozentuale Schwankung als bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* gemessen werden. Trotz der oben beschriebenen Schwankungen an Tag 3 und 4 bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* lies sich keine Signifikanz beim direkten Vergleich der beiden Stimulationsansätze bezüglich des kalkulierten Anteils antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an der Gesamtheit der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ an jedem der untersuchten Tage feststellen (siehe Abb. 17). Die gegen die verwendeten Influenzaantigene gerichteten IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ konnten – ungeachtet ihres geringen prozentualen Anteils an den IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ – bei allen untersuchten Individuen eindeutig nachgewiesen werden



**Abb. 17:** Vergleich der zwei *In-vitro*-Stimulationsansätze im Hinblick auf den Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ

Gegenüberstellung des prozentualen Anteils antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an der Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ nach 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2 und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21. Dargestellt sind die Zellspender, deren Zellen parallel mit beiden Stimulationsansätzen zur Differenzierung angeregt wurden, sowie die beiden untersuchten Antigene A/California/09/2007 rHA (**A - E**) und A/Texas/50/2012 rHA (**F - J**). ns nicht signifikant

Neben der Gesamtkonzentration von IgG wurde auch die Menge des gegen die zwei verwendeten Antigene gerichteten, antigenreaktiven IgG in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Da die Antikörper im Kulturmedium über die sich auf der Mikrotiterplatte befindenden Antigene gebunden werden, wurde als Maßeinheit die Angabe einer zur IgG-Standardkonzentration äquivalenten Konzentration gewählt.



**Abb. 18:** Antigenreaktives IgG in den Zellkulturüberständen

Neben der Gesamtmenge an sezerniertem IgG wurde in den Zellkulturüberständen der parallel mit beiden Stimulationsansätzen stimulierten Zellspender die Menge an antigenreaktivem IgG nach *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2 (**A** und **C**) und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 (**B** und **D**) bestimmt. Dabei wurde analog zum FluoroSpot-Assay die Antigenreaktivität gegenüber den Influenzaantigenen A/California/07/2009 rHA (n=12) (**A** und **B**) und A/Texas/50/2012 rHA (n = 6) (**C** und **D**) gemessen. \*  $p < 0,05$

Anmerkung zu (**A**) und (**B**): Die Menge an sezerniertem IgG wurde an Tag 3 und 4 beispielhaft nur für 6 der 12 Spender bestimmt.

Beim Vergleich der beiden untersuchten Antigene lässt sich feststellen, dass – im Einklang mit den im FluoroSpot-Assay gemessenen, prozentualen Anteilen antigenreak-

tiver ASZ an der Gesamtanzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ – in allen Kulturüberständen eine weitaus geringere IgG-Konzentration gemessen werden konnte, deren Antigen-spezifität sich gegen das HA von A/Texas/50/2012 richtet. Für zwei der untersuchten Zellspender konnte an Tag 11 bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* nur eine äquivalente Konzentration von 0,66 ng/ml bzw. 0,68 ng/ml gemessen werden; obwohl antigenreaktive IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ im FluoroSpot-Assay nachgewiesen werden konnten. Die gleichen Zellspender wiesen in ihren Kulturüberständen bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* eine ~ 10- bis 100-fach höhere Konzentration von antigenreaktivem IgG an Tag 11 auf.

Für fünf der sechs untersuchten Zellspender ließ sich ab Tag 7 bei der Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* eine höhere Konzentration an antigenreaktiven IgG gegen A/Texas/50/2012 rHA nachweisen.

Bei Betrachtung der antigenreaktiven IgG, deren Spezifität gegen A/California/09/2007 rHA gerichtet ist, fielen bei beiden Stimulationsansätzen zwei Zellspender mit einem starken Anstieg der IgG-Konzentration ab Tag 6 bzw. Tag 7 auf. Hierbei war einer der dazugehörigen Zellspender bei beiden Stimulationsansätzen identisch. Auffallend ist, dass bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* an Tag 3 in den Zellkulturüberständen aller Individuen kein antigenspezifisches IgG gemessen werden konnte. Auch lässt sich die bereits im FluoroSpot-Assay erkennbare Rechtsverschiebung bei Betrachtung der Konzentrationen in den Kulturüberständen erkennen. Bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* konnte an allen Tagen ein höherer  $\bar{x}$  gemessen werden.

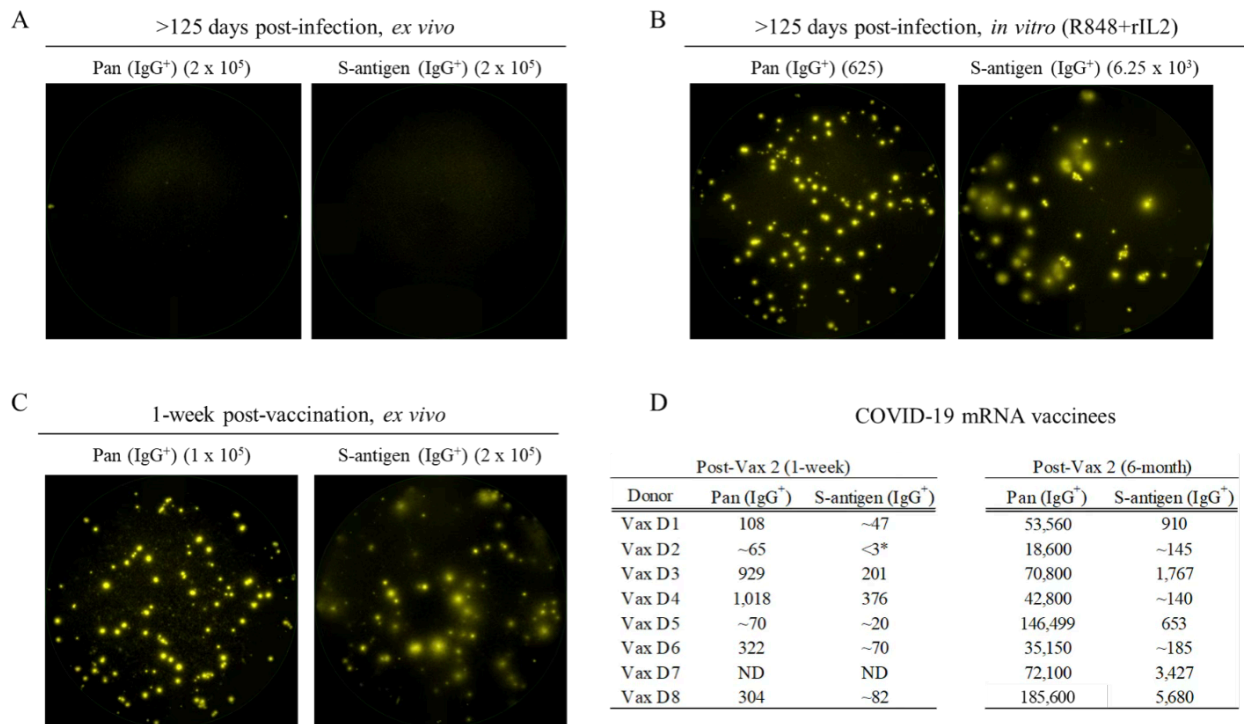
### 3.3 COVID-19

#### 3.3.1 Detektion von IgM/G/A/E<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nach COVID-19-Impfung ohne (*ex vivo*) und mit *In-vitro*-Stimulation

Zur Klärung der Fragestellung, inwiefern eine *In-vitro*-Stimulation vor Durchführung eines FluoroSpot-Assays notwendig ist, wurden PBMC von acht Individuen – welche im Rahmen der COVID19-Pandemie zwei Vakzinierungen mit einem mRNA-Impfstoff erhalten haben – zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Hierfür wurden die im Blutkreislauf zirkulierenden Zellen eine Woche nach der zweiten Impfung durch Leukapherese entnommen und ohne *In-vitro*-Stimulation ein FluoroSpot-Assay zum Nachweis IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ und antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ gegenüber dem S-

Antigen des SARS-CoV-2 durchgeführt (siehe Abb. 19 C). Mehr als 125 Tage nach Erhalt der zweiten Impfung konnten ohne vorherige *In-vitro*-Stimulation bei allen untersuchten Individuen keine (antigenreaktiven) IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ im FluoroSpot-Assay nachgewiesen werden (siehe Abb. 19 A). Dagegen konnten diese nach Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* detektiert werden (siehe Abb. 19 B). Wurde der FluoroSpot-Assay eine Woche nach Erhalt der zweiten Impfung durchgeführt, konnten auch ohne *In-vitro*-Stimulation bei sieben der acht untersuchten Zellspender die im Blut zirkulierenden Plasmablasten nachgewiesen werden. Bei dem in *Abb. 19 D* dargestellten, direkten Vergleich der detektierten bzw. extrapolierten Anzahl (antigenreaktiver) IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ fällt eine Diskrepanz zwischen der Anzahl *in vivo* und durch *In-vitro*-Stimulation induzierter ASZ auf. Für Donor 4 konnte *ex vivo* eine Anzahl antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ detektiert werden, die 36,93 % der Gesamtanzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ ausmachte. Insgesamt war der  $\bar{x}$  des prozentualen Anteils antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ eine Woche nach Erhalt der zweiten Impfung 11,41-fach höher als sechs Monate nach Vakzinierung und *In-vitro*-Stimulation. Zusätzlich war sechs Monate nach Vakzinierung der Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ, deren Spezifität sich gegen das S-Protein richtet, kleiner als in der Kohorte der rekonvaleszenten Zellspender. Die Daten für Donor 7 werden nicht gezeigt, da dieser nicht innerhalb von sieben Tagen nach der zweiten Vakzinierung getestet wurde.

Die acht in *Abb. 19* aufgeführten Spender, sowie acht genesene Individuen, wurden nach *In-vitro*-Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* zusätzlich hinsichtlich ihrer Anzahl IgM/G/A/E<sup>+</sup>- und antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ untersucht und verglichen (siehe *Abb. 20 A* und *B*). Sechs der acht genesenen Zellspender (rot) zeigten eine Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ, die über dem  $\bar{x}$  beider Kohorten lag, während bei Betrachtung von IgM und IgA die Zellspender beider Kohorten sich gleichmäßig um den  $\bar{x}$  verteilten. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der genesenen und vakzinieren Kohorte in Bezug auf die gemessene Anzahl IgM/G/A/E<sup>+</sup>-sezernierender ASZ festgestellt werden, wobei ein großer interindividueller Unterschied bezüglich der gemessenen Anzahl IgM/G/A<sup>+</sup>-sezernierender ASZ auffiel.



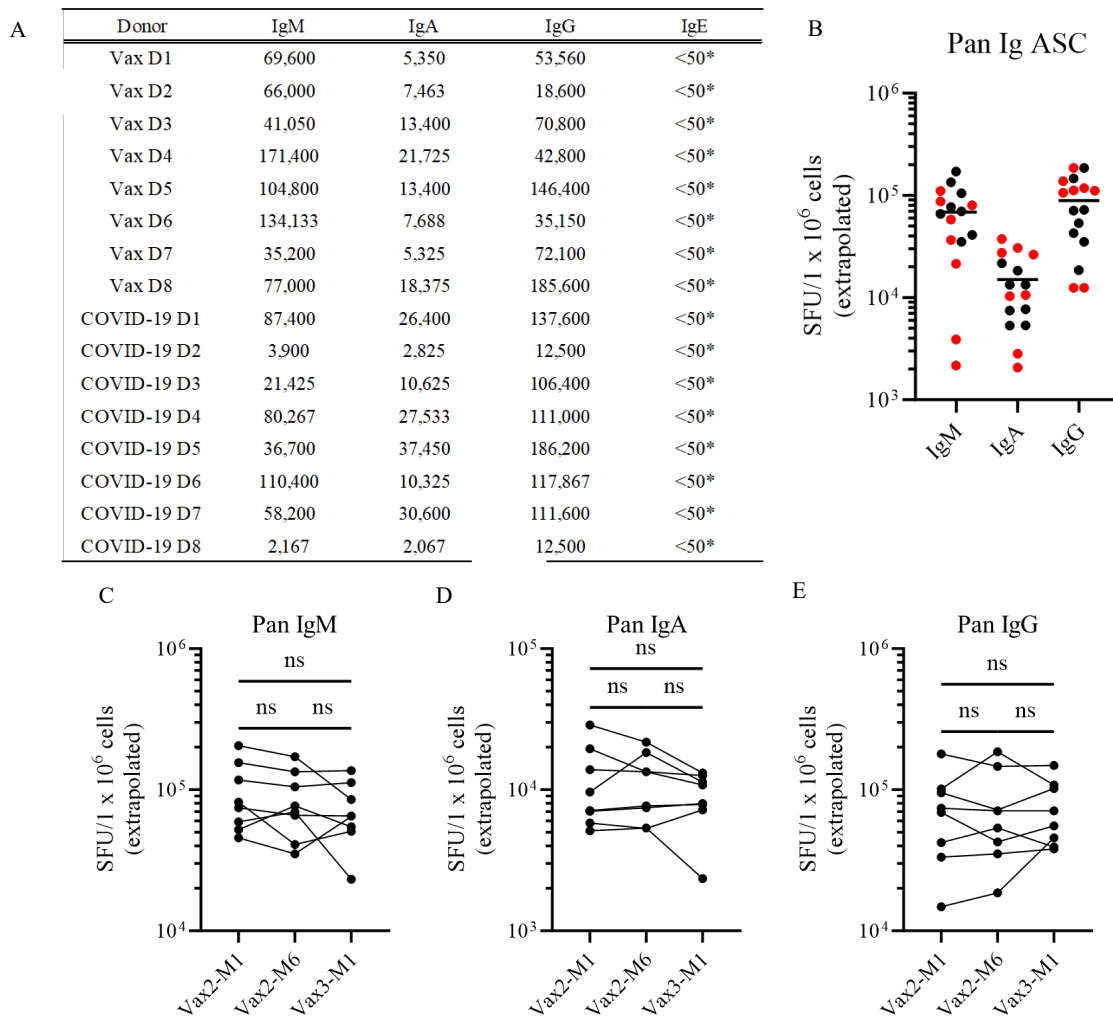
**Abb. 19:** FluoroSpot-Assay nach COVID-19-Impfung (*ex vivo*) und *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2

Im Rahmen der COVID-19-Pandemie wurden die PBMC von Zellspendern untersucht, die vor Ausbruch der Pandemie gewonnen wurden und diese mit PBMC derselben Zellspender nach durchgeführter zweiter Impfung mit einem mRNA-Impfstoff (7 Tage nach Vakzinierung) und > 125 Tage nach ebendieser verglichen. Für die Bestimmung der antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ wurde das S-Antigen des SARS-CoV-2 verwendet. Ohne *In-vitro*-Stimulation konnten >125 Tage nach Immunisierung keine (antigenreaktiven) IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nachgewiesen werden (**A**) – jedoch nach *In-vitro*-Stimulation über 5 Tage mit R848 + rIL-2 (**B**). Sieben Tage nach der erfolgten zweiten Impfung waren auch ohne *In-vitro*-Stimulation im Blut zirkulierende (antigenreaktive) IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ nachweisbar (**C**). Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für sieben weitere Zellspender eine Woche (ohne *In-vitro*-Stimulation) bzw. sechs Monate (nach 5 Tagen *In-vitro*-Stimulation mit R848 + rIL-2) nach Erhalt der zweiten Vakzinierung, gemittelt oder extrapoliert für einen Zellinput von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen (**D**). Fluorochrom: TRITC, Exzitationswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm, Lichtquelle: 570 nm, Filter: 600 nm, Vergrößerung: 2,03

~ keine genaue Anzahl ermittelt, <3 \* keine ASZ detektiert, ND nicht untersucht

Copyright Lehmann et al. (2025) Creative Common License CC BY-NC-ND 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Bei Untersuchung der vakzinieren Kohorte an drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der zweiten oder dritten COVID-19-Impfung konnte bei Betrachtung der Gesamtanzahl



**Abb. 20:** FluoroSpot-Assay zur Bestimmung der Häufigkeit von IgM/G/A/E<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nach COVID-19-Impfung oder Rekonvaleszenz

Acht geimpfte Donoren (zweite mRNA-Impfung gegen COVID-19) sowie acht nach COVID-19-Infektion genesene Individuen wurden mit R848 + rIL-2 *in vitro* stimuliert und hinsichtlich der Anzahl IgM/G/A/E<sup>+</sup>-sezernierender ASZ verglichen (**A**). Die dargestellte Anzahl von *Spot forming units* (SFU) wurde für einen Zellinput von  $1 \times 10^6$  Zellen extrapoliert. Dabei konnten für alle Donoren keine IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nachgewiesen werden (< 50\*). Darstellung derselben Daten als Streudiagramm mit logarithmischer Achseneinteilung. Die von einer COVID-19-Infektion genesenen Zellspender sind als rote Punkte dargestellt (**B**). Die acht geimpften Donoren wurden zu mehreren Zeitpunkten (1 Monat bzw. 2 Monate nach der 1. Booster-Impfung und 1 Monat nach der 2. Booster-Impfung) auf ihre Anzahl IgM/G/A<sup>+</sup>-sezernierender ASZ untersucht (**C** - **E**). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden (ns). < 50\* weniger als eine ASZ in einem oder mehr Well(s) mit einem Zellinput von  $2 \times 10^4$  PBMC

Copyright Lehmann et al. (2025) Creative Common License CC BY-NC-ND 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

IgM/G/A<sup>+</sup>-sezernierender ASZ kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten gemessen werden (siehe Abb. 20 C - E).

### 3.3.2 Detektion antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nach COVID-19-Impfung oder Genesung

Für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Antigenreaktivität gegenüber Antigenen des neuartigen SARS-CoV-2 wurden die vakzierten oder genesenen Zellspender zusätzlich mit zehn PBMC-Spendern verglichen, deren Zellen vor Beginn der COVID-19-Pandemie kryokonserviert worden sind. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Individuen zum Zeitpunkt der Leukapherese Kontakt mit Antigenen des SARS-CoV-2 hatten und eignen sich daher als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde das Antigenpanel um das NCAP ergänzt.

Alle untersuchten Individuen wiesen fünf Tage nach *In-vitro*-Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ auf. Die drei untersuchten Kohorten unterschieden sich nicht hinsichtlich des  $\bar{x}$  der detektierten Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ (siehe Abb. 21). Für die Zellspender, deren PBMC vor Ausbruch der COVID-19-Pandemie gewonnen wurden, konnten IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ, aber keine antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ gegenüber den beiden SARS-CoV-2-Antigenen nachgewiesen werden (siehe Abb. 21 A). Eine Ausnahme bildet hierbei einer der untersuchten Zellspender, bei dem zehn antigenreaktive ASZ pro  $1 \times 10^6$  PBMC detektiert werden konnten, deren Spezifität gegen das NCAP gerichtet war. Eine Immunantwort gegenüber dem S-Protein konnte für diesen Zellspender nicht nachgewiesen werden.

Bei Untersuchung der geimpften Zellspender sechs Monate nach Immunisierung konnten für alle Individuen antigenreaktive IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ, deren Spezifität gegen das S-Protein gerichtet war, detektiert werden (siehe Abb. 19 D und Abb. 21 B). Der durchschnittliche prozentuale Anteil S-reaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ war weitaus niedriger als eine Woche nach Erhalt der ersten Booster-Impfung und auch niedriger als in der genesenen Kohorte. Der Anteil der antigenreaktiven ASZ an der Gesamtheit der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ wies eine große interindividuelle Schwankung auf, sodass bei einem der geimpften Zellspender (Donor 7) ein Anteil von 4,75 % gegen das S-Protein gerichteter ASZ gemessen werden konnte. Donor 3 wies als einziger Zellspender der Kohorte Antigenreaktivität gegenüber dem NCAP von SARS-CoV-2 auf.

		S-antigen	NCAP	Pan IgG		
<b>A</b>	Pre-COVID	Donor 1	<10*	~10	181,333	Pan IgG $\bar{x} \pm \sigma$ 100,779 $\pm$ 48,263
		Donor 2	<10*	<5*	105,867	
		Donor 3	<10*	<5*	53,600	
		Donor 4	<10*	<5*	50,200	
		Donor 5	<10*	<5*	181,333	
		Donor 6	<10*	<5*	67,200	
		Donor 7	<10*	<5*	109,227	
		Donor 8	<10*	<5*	109,467	
		Donor 9	<10*	<5*	58,200	
		Donor 10	<10*	<5*	91,360	
<b>B</b>	Post-Vax 2 (6-month)	Donor 1	910	<5*	53,560	Pan IgG $\bar{x} \pm \sigma$ 78,126 $\pm$ 57,995
		Donor 2	~290	<5*	18,600	
		Donor 3	1,767	~25	70,800	
		Donor 4	~280	<5*	42,800	
		Donor 5	653	<5*	146,400	
		Donor 6	~370	<5*	35,150	
		Donor 7	3,427	<5*	72,100	
		Donor 8	5,680	<5*	185,600	
<b>C</b>	PCR-verified	Donor 1	6,050	545	137,600	Pan IgG $\bar{x} \pm \sigma$ 99,458 $\pm$ 59,486
		Donor 2	~170	~35	12,500	
		Donor 3	2,085	573	106,400	
		Donor 4	1,915	537	111,000	
		Donor 5	13,920	2,035	186,200	
		Donor 6	2,707	~100	117,867	
		Donor 7	1,530	1,855	111,600	
		Donor 8	510	~45	12,500	

NS

NS

NS

**Abb. 21:** Vergleich der Antigenreaktivität gegenüber SARS-CoV-2-Antigenen

PBMC von Zellspendern deren PBMC vor der COVID-19-Pandemie kryokonserviert wurden (**A**), geimpften (**B**) und genesenen Zellspendern (**C**) wurden für 5 Tage *in vitro* mit R848 + rIL-2 stimuliert. Dargestellt ist die Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender, sowie antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ, deren Spezifität sich gegen das S-Protein bzw. NCAP des SARS-CoV-2 richtet. Die angegebene Anzahl ASZ wurde anhand der detektierten antigenreaktiven ASZ pro Zellinput für einen Zellinput von  $1 \times 10^6$  Zellen extrapoliert.

~ keine genaue Anzahl ermittelt, <10\* weniger als eine ASZ in einem oder mehr Well(s) mit dem S-Antigen und einem Zellinput von  $1 \times 10^5$  PBMC, <5\* weniger als eine ASZ in einem oder mehr Well(s) mit NCAP und einem Zellinput von  $3 \times 10^5$  PBMC

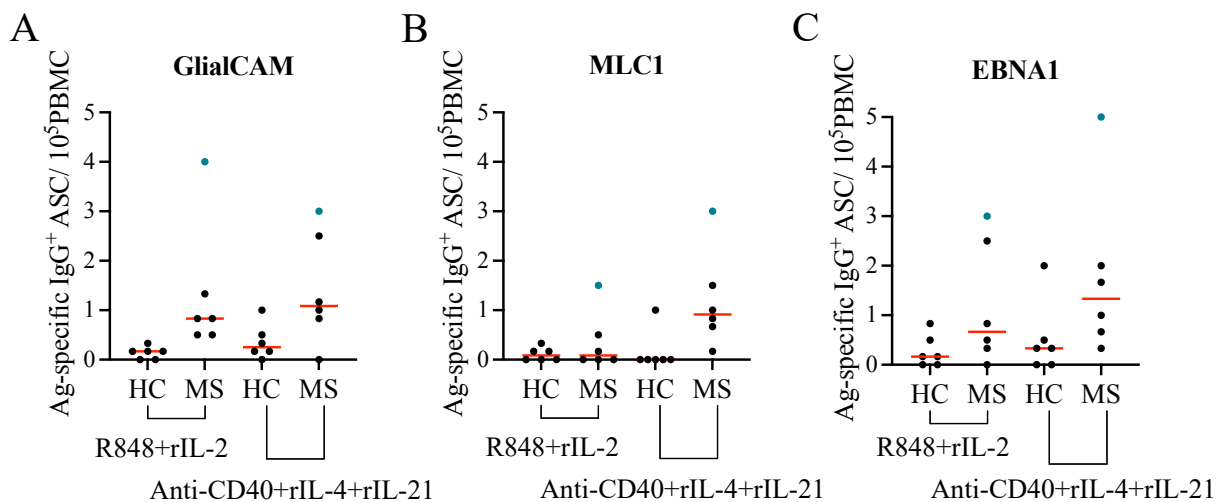
Copyright Lehmann et al. (2025) Creative Common License CC BY-NC-ND 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Nach durchgemachter Infektion konnten bei allen Zellspendern antigenreaktive ASZ gegen die beiden untersuchten Antigene detektiert werden (siehe Abb. 21 C). Die Anzahl gegen das S-Protein gerichteter ASZ war dabei 5,05-fach größer als die Anzahl der gegen das NCAP gerichteten IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ.

### 3.4 Multiple Sklerose

#### 3.4.1 Detektion antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bei MS-Patienten

Im Rahmen klinischer Untersuchungen zur MS wurde die Methodik zur Etablierung eines FluoroSpot-Assays zum Nachweis antigenreaktiver B-Gedächtniszellen gegenüber einem potenziellen neuen Antigen der MS, dem MLC1-Protein (Dahl et al., 2025), sowie GlialCAM und EBNA1 verwendet.



**Abb. 22:** Vergleich der Antigenreaktivität gegenüber GlialCAM, MLC1 und EBNA1 zwischen gesunden Probanden und MS-Erkrankten

PBMC von 12 Zellspendern wurden für 5 Tage *in vitro* mit R848 + rIL-2 und Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21 stimuliert. Dargestellt ist der Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ, deren Spezifität sich gegen GlialCAM (A), MLC1 (B) bzw. EBNA1 (C) richtet bei einem Zellinput von  $1 \times 10^5$  PBMC. Der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  ist als roter Querbalken dargestellt. Der an MS erkrankte Zellspender mit der größten Anzahl detektierter, antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ gegen alle drei der untersuchten Antigene – unabhängig vom verwendeten Stimulationsansatz – ist als grüner Punkte (●) dargestellt. Gesunde Kontrollgruppe (HC), MS-Erkrankte (MS)

Hierbei konnte bei allen untersuchten Antigenen eine durchschnittlich höhere Anzahl antigenreaktiver ASZ, deren Spezifität sich gegen Strukturen dieser Proteine richtet, in der Gruppe der untersuchten MS-Erkrankten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nach fünf Tagen *In-vitro*-Stimulation – parallel mit beiden Stimulationsansätzen – nachgewiesen werden (siehe Abb. 22). Bei fünf von sechs Probanden der gesunden Kontrollgruppe konnten – bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* – keine antigenreaktiven

IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ gegen MLC1 detektiert werden. Der Nachweis gelang aber bei allen MS-Erkrankten (siehe Abb. 22 B). Limitierend ist anzuführen, dass bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* bei der Hälfte der gesunden Probanden eine Reaktivität gegenüber MLC1 nachgewiesen werden konnte.

Im Rahmen der Untersuchung wurden die PBMC parallel mit *Stimulationsansatz 1* und *Stimulationsansatz 2* für fünf Tage *in vitro* stimuliert. Hierbei konnte bei allen untersuchten Antigenen ein höherer prozentualer Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* gemessen werden. Während für drei der MS-Erkrankten keine Antigenreaktivität gegenüber MLC1 bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* nachgewiesen werden konnte, konnte bei allen MS-Erkrankten diese bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* detektiert werden. Ein Proband aus der MS-Kohorte stach besonders hervor, da er – unabhängig vom verwendeten Stimulationsansatz – gegenüber allen untersuchten Antigenen den höchsten Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ aufwies (siehe Abb. 22, Proband als grüner Punkt (●) dargestellt).

## 4. Diskussion

### 4.1 *In-vitro*-Stimulation

Zu Beginn der Zellkultur wiesen die verwendeten PBMC einen hohen Anteil an vitalen Zellen auf (siehe Abb. 7 B und Abb. 8 B) und verdeutlichen damit die gute Resilienz der Zellen gegenüber der Kryokonservierung und einen schonenden Auftauprozess. Diese Beobachtung steht im Einklang mit weiteren wissenschaftlichen Publikationen (Ramachandran et al., 2012; Wolf et al., 2022), wobei *Ramachandran et al.* den in dieser Arbeit verwendeten Auftauprozess mit vorgewärmtem Wash-Medium für T-Zellen beschrieben haben. Auch zwei weitere Studien konnten eine hohe Funktionalität der B-Zellen nach Kryokonservierung im Vergleich zu frischen PBMC demonstrieren (Fecher et al., 2018; Marsman et al., 2022). Eine weitere Studie berichtet von einem höheren Anteil vitaler Zellen von bis zu 97 % nach dem Auftauprozess, abhängig vom verwendeten Kryokonservierungsverfahren (Li et al., 2021).

Der in dieser Arbeit vorgestellte Vergleich der Anzahl antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ nach Rekonvaleszenz bzw. Impfung gegen COVID-19 verdeutlicht die Vorteile und Notwendigkeit der *In-vitro*-Stimulation (siehe Abb. 19). Für alle untersuchten Zellspender konnte eine weitaus größere absolute Anzahl von IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ nach *In-vitro*-Stimulation im Vergleich zur direkten Untersuchung der PBMC, eine Woche nach Immunisierung, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Untersuchung von *Scholzen et al.* (2014), die von einer 6,04-fach höheren Anzahl von B-Zellen nach der *In-vitro*-Stimulation über fünf Tage im Vergleich zur *Ex-vivo*-Kohorte berichtet. Die Verwendung eines anderen Stimulationsansatzes sowie die fehlende anamnestiche Erhebung einer vorherigen Vakzinierung/Infektion limitieren jedoch die Vergleichbarkeit und erklären möglicherweise die in dieser Arbeit gemessene, weitaus größere Diskrepanz der detektierten Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ zwischen der *Ex-vivo*- und *In-vitro*-Kohorte (siehe auch 4.2.1 FluoroSpot zur Evaluation von Impfungen gegen COVID-19). Der fehlende Nachweis von antigenreaktiven ASZ mehr als 125 Tage nach der Vakzinierung ohne vorherige Kultivierung der PBMC mit *Stimulationsansatz 1*, verdeutlicht die Notwendigkeit einer *In-vitro*-Stimulation der B-Zellen. Zusätzlich stehen diese Beobachtungen im Einklang mit einer weiteren Studie, die sich mit der Evaluation von Impfungen gegen COVID-19 auseinandersetzt und drei bzw. sieben Monate nach der zweiten

Impfung ohne *In-vitro*-Stimulation keine antigenreaktiven Immunglobuline in den B-Zell-Kulturen nachweisen konnte (Jose-Cascon et al., 2022). Der Nachweis gelang jedoch nach *In-vitro*-Stimulation der Zellen.

Zusammenfassend kommt diese Forschungsarbeit – im Einklang mit weiteren Studien (Jose-Cascon et al., 2022; Marsman et al., 2022; Scholzen et al., 2014) – zu der Auffassung, dass eine *In-vitro*-Stimulation vor Durchführung eines FluoroSpot-Assays unabdingbar für eine zuverlässige Beurteilung der Zusammensetzung der B-Gedächtniszellpopulation eines Individuums ist. Dies gilt besonders für die Beurteilung niederfrequenter Antigenspezifitäten und bei unbekanntem zeitlichem Abstand zur letzten (Re-) Exposition des Individuums gegenüber dem Antigen von Interesse.

#### 4.1.1 Vergleich der beiden Stimulationsansätze

Grundsätzlich konnte im Rahmen der *In-vitro*-Stimulation über 11 Tage gezeigt werden, dass *Stimulationsansatz 1* einige Zellspender zur stärkeren Proliferation – besonders in den ersten 3 - 5 Tagen der Zellkultivierung – anregen konnte als *Stimulationsansatz 2*. Diese Beobachtung steht im Einklang mit zwei weiteren Studien, die *Stimulationsansatz 1* als potentesten Stimulationsansatz zur Differenzierung von B-Zellen zu ASZ identifiziert haben (Jahnmatz et al., 2013; Pinna et al., 2009). Der Anteil lebendiger Zellen nach fünf Tagen *In-vitro*-Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* stimmt mit den Ergebnissen von Wolf et al. (2022) überein. Es muss angemerkt werden, dass die gemessene Anzahl vitaler Zellen/ml größere interindividuelle Schwankungen aufwies als bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2*. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise mit der geringeren Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* erklären (siehe Ab. 9). Zusätzlich sprechen die geringeren Schwankungen dafür, dass *Stimulationsansatz 2* die enthaltenen B-Zellen nicht weniger intensiv zur Proliferation und Differenzierung anregt, sondern zielgerichteter die B-Gedächtniszellen stimuliert (Ettinger et al., 2005; Franke et al., 2020). Die dadurch bedingte geringere Anzahl proliferativ aktiver Zellen ist möglicherweise der Grund für die länger andauernde Proliferation und den konstanten Anteil vitaler Zellen im BCM; durch Verhinderung einer frühzeitigen „Erschöpfung“ der Stoffwechselfvorgänge in den sich differenzierenden Zellen durch begrenzte Nährstoffe sowie durch die geringere Akkumulation von toxischen Metaboliten und dadurch bedingte Aktivierung pro-apoptotischer Signalkaskaden. Dies spiegelt sich

in einer länger anhaltenden Plateauphase bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* wider. Es konnte für den *Stimulationsansatz* ein niedrigerer, aber stabiler, prozentualer Anteil vitaler Zellen von Tag 3 bis einschließlich Tag 6 gezeigt werden. Diese Beobachtungen entsprechen den gewonnenen Erkenntnissen aus den durchgeführten FluoroSpot-Assays, sodass beide Untersuchungen für eine Rechtsverschiebung der Proliferation und Differenzierung der B-Zellen, hin zu einer längeren Stimulations- und Kultivierungsdauer bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2*, sprechen. Analog zu dieser Arbeit berichten *Karahan et al.* (2014) von einem ausgeprägten Abfall des Anteils vitaler Zellen nach sechs Tagen *In-vitro*-Stimulation. Diese Ergebnisse – zusammen mit der in dieser Arbeit detektierten Anzahl von ASZ an Tag 7 – stehen in Kontrast zu einer Publikation, die von einem Anstieg der Plasmablasten bis einschließlich Tag 9 bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 2* berichtet (*Marsman et al.*, 2022). Relativierend muss angemerkt werden, dass in der aufgeführten Studie die Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht wurden, sodass keine Aussage über die Funktionalität und Sekretionsleistung getroffen werden konnte. Da im FluoroSpot-Assay ausschließlich sekretorisch aktive B-Zellen detektiert werden können, könnte eine mögliche Diskrepanz zwischen Phänotyp und Funktionalität der Plasmablasten die konträren Ergebnisse erklären.

Zusammenfassend lassen sich anhand der erhobenen Daten folgende Schlussfolgerungen hinsichtlich der Kultivierung und *In-vitro*-Stimulation von B-Lymphozyten ziehen:

1. *Anti-CD40 + rIL-21* stimuliert die Differenzierung von B-Gedächtniszellen in ASZ langsamer, aber gleichmäßiger und langanhaltender als *R848 + rIL-2*
2. Bei Verwendung von *R848 + rIL-2* ist eine Stimulation über 4 - 5 Tage, bei Verwendung von *Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21* ist eine Stimulation über 5 - 6 Tage zu empfehlen
3. Sollen beide *Stimulationsansätze* parallel angewendet werden so empfiehlt sich die Durchführung des FluoroSpot-Assays an Tag 5.

#### 4.1.2 Immunglobulinsekretion

Bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* wurde für die Mehrheit der Zellspender die größte Anzahl IgM<sup>+</sup>- und IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 4 detektiert. Allein für IgG<sup>+</sup>-sezer-

nierenden ASZ erreichte die Mehrheit der untersuchten Donoren erst an Tag 5 ihre maximale Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ. Im Einklang mit diesen Beobachtungen berichten auch *Crotty et al.* und *Weiss et al.* von der maximal detektierbaren Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ im ELISPOT-Assay nach fünf bis sechs Tagen *In-vitro*-Stimulation mit *Pokeweed mitogen* und *Staphylococcus aureus* Cowan (*Crotty et al., 2004*) bzw. *Staphylococcus aureus* Cowan und IL-10 (*Weiss et al., 2012*). Im Gegensatz zu dieser Arbeit empfehlen *Weiss et al. (2012)* aber eine *In-vitro*-Stimulation für bis zu acht Tage, da bis einschließlich Tag 10 keine signifikante Veränderung der Anzahl IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ gemessen werden konnte.

Bei detaillierterer Betrachtung und Aufschlüsselung der Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ in ihre einzelnen Subklassen, bestätigt sich die für Pan-IgG<sup>+</sup> gemachte Beobachtung. Obwohl die maximale Anzahl IgG2/3/4-sezernierender ASZ an Tag 4 detektiert werden konnte, erreichen die IgG1-sezernierenden ASZ ihr Maximum erst an Tag 5. Da IgG1 60 % des sezernierten IgG verantwortet (*Vidarsson et al., 2014*), erklärt dies, dass der Tag der maximalen Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ mit dem der IgG1-sezernierenden ASZ übereinstimmt und vom Tag der anderen IgG-Suklassen abweichen kann. Obwohl IgG2 32 % der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ ausmacht (*Vidarsson et al., 2014*) und die maximale Anzahl an Tag 4 ( $\bar{x} = 95,86$  %) mit einem starken Abfall für einige Zellspender hin zu Tag 5 ( $\bar{x} = 59,89$  %) beobachtet werden konnte, wird dieser Abfall – bei Betrachtung der Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ – sehr wahrscheinlich durch die Steigerung der IgG1-sezernierender ASZ ausgeglichen, sodass die größte Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 5 gemessen werden konnte. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit einer Studie, die bei der Aufschlüsselung von antigenreaktivem IgG gegen ein Antigen des Zytomegalievirus in seine Subklassen aufzeigen konnte, dass die Anzahl IgG1-sezernierender ASZ annähernd der Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ entspricht (*Terlutter et al., 2018*). Auch eine Studie zur Impfantwort gegen das *Middle east respiratory syndrome*-Coronavirus (*Weskamm et al., 2022*), Analysen der IgG-Subklassen in Serumproben (*Chakraborty et al., 2021*) und innerhalb der B-Gedächtniszellpopulation von COVID-19-Erkrankten (*Hartley et al., 2020*) konnten aufzeigen, dass IgG1 für den Großteil der IgG-Antwort verantwortlich ist.

Unabhängig von der untersuchten (Sub-) Klasse lässt sich eine Verschiebung der maximal detektierbaren Anzahl ASZ von Tag 4 und 5 hin zu Tag 5 und 6 bei Stimulation

mit *Stimulationsansatz 2* beobachten. Bei Betrachtung der aufgeschlüsselten Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ weisen alle vier Subklassen den größten  $\bar{x}$  ( $\bar{x} > 96,30\%$ ) und die kleinste  $\sigma$  ( $\sigma < 5,90\%$ ) an Tag 6 auf. Dies deckt sich mit der an diesem Tag gemessenen größten Anzahl Pan-IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ.

Bezüglich der absoluten Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ konnte bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* – analog zu den Ergebnissen einer anderen Studie (Franke et al., 2020) – eine Reduktion IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ beobachtet werden (siehe auch 4.1.1 Vergleich der beiden Stimulationsansätze). Diese ist möglicherweise durch die selektivere Stimulation von B-Gedächtniszellen bedingt. Zu diesen zählen aber auch IgM<sup>+</sup>-sezernierende Gedächtniszellen (Übersichtsartikel (Budeus et al., 2023)), sodass diese die Detektion von einzelnen IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ erklären können. Diese Beobachtungen werden zusätzlich durch Experimente gestützt, die belegen konnten, dass IL-21 pro-apoptotisch auf naive – IgM<sup>+</sup>-sezernierende – B-Zellen wirkt (Ozaki et al., 2004). Untermauert wird diese These auch durch eine Studie, die bei Personen, die am X-chromosomalen Hyper-IgM-Syndrom erkrankt sind – und sich durch hohe IgM-Spiegel im Plasma auszeichnen – eine Mutation und einen dadurch bedingten Defekt des CD40L nachweisen konnte (Allen et al., 1993).

Bei Stimulation der Zellen mit *Stimulationsansatz 1* konnte bereits an Tag 3 bei der Mehrzahl der Zellspender ein Anteil IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ von über 50 % nachgewiesen werden. Diese frühe Detektion einer großen Anzahl IgM<sup>+</sup>-sezernierender ASZ lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Differenzierung von IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ mehr Zeit benötigt als die Differenzierung von IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ. Diese Hypothese wird durch eine andere Studie gestützt, die einen früheren Anstieg von IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ im Vergleich zu IgG1-sezernierenden ASZ bei der *In-vitro*-Stimulation aufzeigen konnte (Hasbold et al., 2004). Trotz des schnellen Nachweises von IgM<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ konnte diese Arbeit auf Ebene der Antigenreaktivität demonstrieren, dass IgM für die Analyse des B-Gedächtniszellkompartiments eines Individuums von nachrangiger Bedeutung ist, da es weitaus unspezifischer ist und in dem Zusammenhang auch eine ausgeprägte Reaktivität gegenüber der Negativkontrolle (Hexa-His) nachgewiesen werden konnte (Daten nicht dargestellt). Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass IgM durch das fehlende Durchlaufen der SHM keine Affinitätssteigerung erfährt und diese geringe Affinität durch seine Avidität kompensiert (Becza et al., 2024). Somit sollte die

Festlegung der optimalen Kultivierungsdauer idealerweise anhand der anderen Immunglobulinklassen erfolgen. Eine Ausnahme bilden repetitive Antigenstrukturen, wie LPS von Bakterien, die durch die hohe Avidität von IgM gebunden werden können und somit bei Evaluation von antibakteriellen Immunantworten auch IgM<sup>+</sup>-sezernierende ASZ von Interesse sind.

Interessanterweise konnte für beide Stimulationsansätze der größte Anteil IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ vor dem Maximum der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ gemessen werden. Dieser frühzeitige Anstieg der IgA<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ lässt nur Mutmaßungen zu und bedarf weiterer Forschungsbestrebungen. Allerdings konnte in CD40-defizienten Mäusen aufgezeigt werden, dass die IgA-Produktion schon in einem Prä-Keimzentrum stattfindet (Bergqvist et al., 2010). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Differenzierung von B-Gedächtniszellen zu IgA<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ *in vitro* möglicherweise schneller abläuft bzw. diese Zellen sich bereits in einem weiter fortgeschrittenen Stadium befinden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* – unabhängig von der betrachteten Immunglobulinklasse – mehrheitlich eine geringere  $\sigma$  auf, was verdeutlicht, dass alle B-Gedächtniszellen trotz inter- und intraindividuellem Unterschiede vergleichbar stark zur Differenzierung zu ASZ angeregt werden und dieser Differenzierungsprozess bei allen Individuen eine ähnliche Zeitspanne benötigt. Diese Erkenntnisse sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Kombination von Anti-CD40 + rIL-2 stark der *In-vivo*-Stimulation der B-Zellen durch die T<sub>FH</sub>-Zellen ähnelt (Nutt et al., 2015; Weinstein et al., 2016). Bei Verwendung von *Stimulationsansatz 1* sind die Ergebnisse weniger einheitlich, sodass über fast alle betrachteten (Sub-) Klassen eine größere  $\sigma$  gemessen werden konnte und dadurch die Bestimmung bzw. Eingrenzung der optimalen Kultivierungsdauer der B-Lymphozyten weniger eindeutig möglich ist.

#### 4.1.3 Die besondere Bedeutung von IgE

Sowohl für die Substanzen Anti-CD40 und IL-4 (Gascan et al., 1991; Moens und Tangye, 2014) als auch IL-21 (Avery et al., 2008; Moens und Tangye, 2014) konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* die Differenzierung von IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ initiieren und diese Wirkung durch die Kombination aller drei Substanzen verstärkt wird (Franke et al., 2020). Ausschließlich bei Verwendung von diesem Stimulationsansatz konnten IgE<sup>+</sup>-sezernierende ASZ bei den sechs untersuchten Zellspendern nachgewiesen werden. Der

fehlende Nachweis von IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ bei fünf von sechs Donoren an Tag 3 und der anschließende Nachweis von IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ bei allen untersuchten Individuen am darauffolgenden Tag lässt vermuten, dass die in den PBMC enthaltenen B-Gedächtniszellen mindestens zwei, der Großteil von ihnen drei oder mehr Tage zum Durchlaufen des CSR benötigen; eine Ausnahme bilden bereits in den PBMC enthaltene, IgE<sup>+</sup>-Gedächtniszellen, welche allerdings nur einen geringen Anteil von 0,03 - 0,074 % der in den PBMC enthaltenen B-Lymphozyten ausmachen (Berkowska et al., 2014; Jimenez-Saiz et al., 2019). Diese Vermutung steht im Einklang mit einer an Lymphozytenkulturen durchgeführten Studie, die sezerniertes IgE erst nachweisen konnte, nachdem die B-Lymphozyten zwei bis vier Zellteilungen durchlaufen hatten (Avery et al., 2008). Im Einklang mit den aufgeführten Studien konnten auch in dieser Arbeit bei den mit *Stimulationsansatz 1* stimulierten PBMC weder IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ, noch in die Kulturüberstände sezerniertes IgE nachgewiesen werden.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen nicht nur die Notwendigkeit einer *In-vitro*-Stimulation der B-Zellen über mindestens drei – idealerweise fünf bis sechs Tage – sondern auch die Vorteile von *Stimulationsansatz 2* zur Evaluation seltener B-Lymphozytenpopulationen, wie IgE<sup>+</sup>-sezernierende ASZ.

Die Beurteilung der IgE-Gedächtniszellen ist – in Anbetracht der kurzen Halbwertszeit von IgE von 2 Tagen im Serum (Lawrence et al., 2017) – besonders für die Allergieforschung von großem wissenschaftlichen Nutzen.

#### 4.1.4 Antigenreaktive IgG<sup>+</sup>-sezernierende ASZ

Bedingt durch die geringe Anzahl detektierter IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 3 der Untersuchungsreihe, führen bereits nur marginale Schwankungen der absoluten Anzahl antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ zu den gemessenen Abweichungen (siehe Abb. 16). Hieraus lässt sich ableiten, dass besonders bei der Evaluation niederfrequenter B-Lymphozyten eine Kultivierungsdauer über vier oder mehr Tage erstrebenswert ist, um eine Verzerrung der Ergebnisse, durch die nur geringe Anzahl, vollständig zu Plasmablasten differenzierter B-Gedächtniszellen, zu vermeiden. Diese Hypothese wird besonders bei Betrachtung des geringen Anteils antigenreaktiver ASZ an der Gesamtheit der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ deutlich. Für Diphtherie, Tetanus (Nanan et al., 2001), Merozoiten von *Plasmodium falciparum* (Jahnmatz et al., 2020) und SARS-CoV-2 (Goel

et al., 2021; Wolf et al., 2022) wird in der Literatur von ähnlich geringen prozentualen Anteilen antigenreaktiver B-Gedächtniszellen berichtet, wie für die in dieser Arbeit untersuchten S-reaktiven bzw. HA-reaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ. Wolf et al. (2022) haben in dem Zusammenhang unter anderem auch den Anteil antigenreaktiver B-Gedächtniszellen gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten HA-Antigenen untersucht. Ebenso konnten vergleichbare Anteile antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ nach Impfung mit drei verschiedenen H1N1-Impfstämmen bei Humanen Immundefizienz-Virus-Infizierten und gesunden Probanden nachgewiesen werden (Sun et al., 2017).

Bezüglich des berechneten Anteils antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an der Gesamtheit der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ an jedem der untersuchten Tage lässt sich feststellen, dass die prozentuale Ausprägung der antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-Antwort unbeeinflusst vom verwendeten Stimulationsansatz ist (siehe Abb. 17). Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von Franke et al. (2020), welche ebenfalls für die beiden in dieser Arbeit untersuchten Influenzaantigene keinen signifikanten Unterschied bezüglich der detektierten Anzahl antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bei Verwendung beider Stimulationsansätze und *In-vitro*-Stimulation über fünf Tage feststellen konnten. Eine weitere wissenschaftliche Arbeit berichtet von einem annähernd konstanten Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ bis zu 30 Tage nach einer trivalenten Influenzaimpfung (Halliley et al., 2010).

Der bei einem Zellspender beobachtete, hohe prozentuale Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ gegenüber A/California/09/2007 rHA war im Verlauf aller Untersuchungstage annähernd konstant und lässt – im direkten Vergleich mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen nach Erhalt einer zweiten COVID-19-Impfung – eine unmittelbar vor der Gewinnung der PBMC erfolgte Influenzaimpfung oder -infektion vermuten. Die maximal detektierte, absolute Anzahl von 1642 (*Stimulationsansatz 1*) bzw. 981 (*Stimulationsansatz 2*) antigenreaktiven IgG<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ pro  $1 \times 10^6$  PBMC (Daten nicht dargestellt) sowie der prozentuale Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ dieses Zellspenders sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien zu Influenzaimpfungen (Ecker et al., 2020; Halliley et al., 2010; Kyu et al., 2009; Wrammert et al., 2011). Auch die Unabhängigkeit des berechneten, prozentualen Anteils vom verwendeten Stimulationsansatz spricht für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse.

## 4.2 Klinische Anwendung

### 4.2.1 FluoroSpot zur Evaluation von Impfungen gegen COVID-19

Die im Rahmen dieser Arbeit zur optimalen Kultivierungsdauer von B-Gedächtniszellen durchgeführten Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer (wiederholten) Impfung gegen COVID-19 verdeutlichen nicht nur die Notwendigkeit einer *In-vitro*-Stimulation von B-Gedächtniszellen sondern auch die Eignung des FluoroSpot-Assays zur Evaluation von Impfantworten. Dies ist besonders bei fehlender (Re-) Exposition des Individuums der Fall, da > 125 Tage nach Impfung keine zirkulierenden ASZ nachgewiesen werden konnten. Dieser Nachweis gelang aber bei allen Zellspendern sieben Tage nach der erfolgten Vakzinierung, was für eine erfolgreiche Immunreaktion des Körpers gegenüber dem applizierten Impfstoff spricht. Eine Studie zu COVID-19-Impfungen berichtet ebenfalls sieben Tage nach der zweiten Immunisierung mit einem mRNA-Impfstoff von einer 5,1-fachen Steigerung des antigenreaktiven IgG in den Zellkulturüberständen ohne vorherige *In-vitro*-Stimulation (Jose-Cascon et al., 2022). Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit gelang den Autoren der erwähnten Studie drei bzw. sieben Monate nach der zweiten Immunisierung kein Nachweis von IgG gegen SARS-CoV-2 ohne vorherige *In-vitro*-Stimulation der B-Zellen (Jose-Cascon et al., 2022).

Weitere Untersuchungen zu SARS-CoV-2 (Rodda et al., 2022), sowie zu Influenzaimpfungen (Halliley et al., 2010; Wrammert et al., 2008), berichten ebenfalls, dass die größte Anzahl antigenreaktiver ASZ im peripheren Blut sieben Tage nach der durchgeführten Impfung nachgewiesen werden konnte.

Im Rahmen der humoralen Immunität eines Individuums sind neben den langlebigen Plasmazellen (Slifka et al., 1998) besonders die B-Gedächtniszellen für die Aufrechterhaltung eines Impfschutzes notwendig, da protektive Antikörpertiter im Laufe der Zeit stark abfallen (Dan et al., 2021; Long et al., 2020; Seow et al., 2020). Durch die fehlende Korrelation zwischen der Ausprägung der antigenreaktiven B-Gedächtniszellpopulation und den gemessenen Serumantikörpertitern (Winklmeier et al., 2022; Wolf et al., 2022) kommt der *In-vitro*-Stimulation und dem FluoroSpot-Assay eine besondere Bedeutung zur Beurteilung eines dauerhaften Impfschutzes des Individuums zu.

Das NCAP von SARS-CoV-2 wurde trotz seiner Lokalisation innerhalb des Viruspartikels als wichtiger Angriffsort für die B- und T-Zell-vermittelte Immunantwort identifiziert (Afkhami et al., 2022; Dugan et al., 2021), sodass im Rahmen anhaltender Impfbestre-

bungen bereits die Schutzwirkung von mRNA-Impfungen gegen NCAP gegenüber einer COVID19-Erkrankung an Mäusen demonstriert werden konnte (Hajnik et al., 2022). Da bis jetzt noch keine Impfung gegen NCAP für den Menschen verwendet wird, ermöglicht die Evaluation der Immunantwort gegenüber NCAP die Differenzierung zwischen geimpften und genesenen Patienten, da nur infizierte Personen Kontakt mit dem NCAP gehabt haben können. Somit ist die Verwendung dieses Antigens im Rahmen von Langzeitimpfstudien zu COVID-19 und zur eindeutigen Differenzierung von geimpften und genesenen Probanden sinnvoll. Der Nutzen einer solchen Differenzierung wird durch Studien bestärkt, die besonders für Personen, die sowohl geimpft als auch genesen sind, eine größer ausgeprägte B-Gedächtniszellpopulation – und damit möglicherweise einen besseren Schutz vor Reinfektion – nachweisen konnten (Bednarski et al., 2022; Goel et al., 2021; Pape et al., 2021; Rodda et al., 2022). Der in dieser Arbeit berichtete, im Vergleich zum S-Antigen, niedrigere Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ, deren Spezifität gegen das NCAP gerichtet ist, deckt sich mit anderen Untersuchungsergebnissen zur Häufigkeit antigenreaktiver B-Gedächtniszellen gegen SARS-CoV-2-Antigene (Wolf et al., 2022). Die für einen Zellspender der Prä-COVID-19-Kohorte detektierte Antigenreaktivität gegenüber dem NCAP von SARS-CoV-2 lässt – bei fehlender Antigenreaktivität aller anderen untersuchten Individuen dieser Kohorte – die Vermutung zu, dass diese Beobachtung durch Kontakt des Spenders mit anderen Coronaviren und kreuzreaktive Antikörper bedingt ist, da das NCAP von SARS-CoV-2 strukturelle Übereinstimmungen mit anderen humanpathogenen Coronaviren aufweist (Peng et al., 2020). In dem Zusammenhang konnten auch kreuzreaktive Antikörper gegenüber dem S-Antigen von SARS-CoV-2 und anderen Coronaviren nachgewiesen werden (Song et al., 2021). Diese These könnte auch für Donor 3 der geimpften Kohorte zutreffen, allerdings ist auch ein Kontakt mit SARS-CoV-2 nach der erfolgten Impfung nicht auszuschließen.

Der in dieser Arbeit beobachtete Abfall des prozentualen Anteils S-reaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ sechs Monate nach der ersten Booster-Impfung steht im Widerspruch zu einer Studie, die bis zu 12 Monate nach einer initialen mRNA-Impfung gegen COVID-19 einen 3,8-fachen Anstieg des Anteils S-reaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektieren konnte (Monzon-Posadas et al., 2023).

Zusätzlich berichtet die erwähnte Studie, sowie eine weitere Publikation, von einem weitaus geringeren Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ nach COVID-19-Impfung als die vorliegende Arbeit (Goel et al., 2021; Monzon-Posadas et al., 2023). Eine mögliche Erklärung für diese konträren Erkenntnisse ist eine Verzerrung der Ergebnisse durch die fehlende *In-vitro*-Stimulation der PBMC am ersten Untersuchungszeitpunkt. Während bei der Impfung eine selektive Anregung von B-Lymphozyten, deren Spezifität gegen das applizierte Antigen gerichtet ist, erfolgt, werden bei der *In-vitro*-Stimulation alle in den PBMC enthaltenen B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt, sodass diese selektive Anregung möglicherweise ursächlich für den gemessenen, hohen Anteil antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ eine Woche nach Vakzinierung ist. Diese hypothetische Verzerrung könnte auch einen Anstieg des Anteils antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ in den ersten sechs Monaten verschleiern.

Die Zuverlässigkeit der gewonnenen Ergebnisse für vakzinierte Zellspender, sechs Monate nach Erhalt einer COVID-19-Impfung, wird durch eine Studie unterstützt, die ebenfalls von einem kleineren Anteil S-reaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ für vakzinierte Spender im direkten Vergleich mit der Gruppe der genesenen Individuen berichtet (Pape et al., 2021). Einschränkend ist diesbezüglich zu erwähnen, dass Reyes *et al.* (2021) von einem geringeren Anteil S-reaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ von 0,1 - 1,8 % für rekonvaleszente Zellspender berichten; in dieser Arbeit betrug der Anteil S-reaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ 1,36 - 7,48 % der detektierten IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ in der Kohorte der genesenen Individuen.

In Bezug auf neue Mutationen und Virusvarianten des SARS-CoV-2 ermöglicht der FluoroSpot-Assay zusätzlich – durch die Verwendung markierter Antigenproben – die Detektion kreuzreaktiver Antikörper, sodass der Assay wertvolle Informationen über den bestehenden Schutz durch eine erfolgte Impfung oder Infektion mit einer früheren Virusvariante liefern kann (Lehmann et al., 2024). Hierbei handelt es sich um einen antigenspezifischen FluoroSpot-Assay, wobei die sezernierten Antikörper nicht – wie in dieser Arbeit beschrieben – über Antigene, sondern – unabhängig von ihrer Antigenpezifität – über *Goat Anti-Human Kappa-UNLB* und *Goat Anti-Human Lambda-UNLB* auf der Membran gebunden werden (siehe auch 2.2.3.1.2 Pan-IgM/G/G1/G2/G3/G4/A/E-Mikrotiterplatten). Anschließend werden die während der Inkubationsperiode sezernierten Immunglobuline nicht über sekundäre und tertiäre Detektionsantikörper, sondern über Antigene,

die vorher mit verschiedenen Fluoreszenzmarkierung versehen wurden, nachgewiesen. Da jeder *Spot* die Sekretionsleistung einer ASZ widerspiegelt, setzt sich dieser folglich nur aus den sezernierten Antikörpern einer ASZ zusammen. Durch die Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen in unmittelbarer Nähe zueinander auf der Mikrotiterplatte – sprich an der Lokalisation eines *Spots* – kann so nachgewiesen werden, dass die sezernierten Antikörper beide Antigenproben binden können und somit eine Kreuzreaktivität vorliegt.

#### 4.2.2 Multiple Sklerose

Durch die Erweiterung dieser Arbeit zur *In-vitro*-Stimulation um Untersuchungen zur B-Zell-vermittelten Autoimmunität in der MS, konnte erfolgreich eine FluoroSpot-Assay für das erst kürzlich durch *Dahl et al. (2025)* vorgestellte, potenzielle MS-Antigen MLC1 etabliert werden. Auch wenn die dargestellten Daten – besonders im Hinblick auf den fehlenden Nachweis einer Antigenreaktivität bei der Hälfte der gesunden Kontrollgruppe – vielversprechend sind, benötigt es noch weitere Forschungsbestrebungen durch die Arbeitsgruppe und eine größere Kohorte, um abschließende Rückschlüsse zur Bedeutung der B-Zell-vermittelten Autoimmunität gegenüber MLC1 bei der Ausbildung einer MS ziehen zu können.

Als weitere Kontrolle wurde auch die Reaktivität gegenüber EBNA1 untersucht, da ein Zusammenhang zwischen der MS und einer EBV-Infektion in der Literatur beschrieben wird (*Lanz et al., 2022*). In dem Zusammenhang konnten *Lanz et al. (2022)* im Mausmodell aufzeigen, dass eine Immunisierung mit EBNA1 zu einer Exazerbation der autoimmunbedingten Demyelinisierung führte und machen hierfür unter anderem auch die nach der Immunisierung gebildeten, kreuzreaktiven Antikörper gegen GlialCAM verantwortlich.

Eine weitere Studie konnte aufzeigen, dass das Vorliegen der beschriebenen Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen EBNA1 und GlialCAM zu einem 1,366-fach höherem Risiko führt, an MS zu erkranken (*Vietzen et al., 2024*). Der Nachweis einer Kreuzreaktivität mit EBNA1 und ein dadurch bedingtes erhöhtes Erkrankungsrisiko gelang auch für ein weiteres Antigen (*Thomas et al., 2023*).

Somit ergibt sich die Frage nach einer möglichen Kreuzreaktivität der gebildeten Antikörper gegen EBNA1/GlialCAM mit MLC1 und ob das Vorliegen einer solchen möglicherweise Rückschlüsse auf das Erkrankungsrisiko oder die Schwere der MS zulässt. Diese

Vermutung wird besonders durch die beschriebene Interaktion und Verbindung zwischen GlialCAM und MLC1 unterstützt (Lopez-Hernandez et al., 2011).

In diesem Zusammenhang wäre die bereits erwähnte Verwendung markierter Antigenproben zur Untersuchung der Kreuzreaktivität empfehlenswert (siehe 4.2.1 FluoroSpot zur Evaluation von Impfungen gegen COVID-19).

Auch besteht ein großes wissenschaftliches Interesse an der Klärung der Frage, ob die Detektion von (kreuzreaktiven) Antikörpern gegen die in dieser Arbeit vorgestellten Antigene, möglicherweise bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung Rückschlüsse auf die Ausbildung einer MS und deren Schwere zulassen und so z. B. die Diagnosestellung in einem frühen Erkrankungsstadium – wie dem KIS oder RIS – erleichtern.

Perspektivisch könnten die gewonnenen Erkenntnisse auch im Rahmen der Entwicklung von Therapeutika eine zielgerichtete Therapie der MS ermöglichen.

#### 4.3 FluoroSpot versus ELISA

In der klinischen Medizin wird weiterhin auf den ELISA als kostengünstige und schnelle Technik zur Evaluation von Impfungen oder akuten/chronischen Infektionen zurückgegriffen. Bedingt durch den Abfall protektiver Antikörpertiter gegen Pathogene wie SARS-CoV-2 (Dan et al., 2021; Long et al., 2020; Seow et al., 2020) oder das Zytomegalievirus (Terlutter et al., 2018) über die Zeit, stellen besonders die B-Gedächtniszellen den Schutz des Individuums vor einer Reinfektion sicher und sind daher für das *Immune Monitoring* von besonderem Interesse. Durch den beschriebenen Abfall weist die Messung von Antikörpern im Blut zum Nachweis einer Immunität einige Schwächen auf. Diese werden besonders durch die fehlende Korrelation zwischen der im Blut gemessenen Menge antigenreaktiver Immunglobuline und der Ausprägung der spezifischen B-Gedächtniszellpopulation deutlich (Winklmeier et al., 2022; Wolf et al., 2022), auch wenn initial – 7 - 10 Tage nach Erhalt einer Influenzaimpfung – eine Korrelation zwischen der Anzahl antigenreaktiver ASZ und den gemessenen Antikörpertitern nachgewiesen werden konnte (Halliley et al., 2010). Des Weiteren berichten die Autoren der aufgeführten Studie, dass die höchste Anzahl antigenreaktiver IgG<sup>+</sup>-sezernierender ASZ 1 - 5 Tage vor dem höchsten gemessenen Antikörpertiter detektiert werden konnte (Halliley et al., 2010), was bei zeitsensiblen Ergebnissen (z. B. bei schweren Verläufen) für die Durchführung eines FluoroSpot-Assays spricht. Dieser Bericht steht im Einklang mit der in dieser Arbeit

gemessenen, geringen Menge (antigenreaktivem) IgG/E in den Kulturüberständen am Tag der maximalen Anzahl detektierbarer IgG/E<sup>+</sup>-sezernierender ASZ. Auch bedingt die geringe Menge an Antikörpern in den Kulturüberständen das Risiko, diese im ELISA nicht messen zu können, da die Menge möglicherweise geringer ist als das Detektionslimit des Assays und somit falsche Rückschlüsse gezogen werden könnten. Dies trifft besonders auf antigenreaktive Antikörper zu, da gezeigt werden konnte, dass diese nur einen geringen Anteil der Pan-IgG-Antikörper ausmachen und somit die Detektion ebendieser eine noch größere Herausforderung darstellt. Diese große Fehleranfälligkeit des ELISAs bei niedrigen Antikörperkonzentrationen erklärt die in *Abb. 18* dargestellten Schwankungen der gemessenen Konzentration antigenreaktiver Antikörper in den Kulturüberständen. Auch konnten für einige Zellspender trotz Kultivierung der PBMC über 11 Tage nur geringe – kaum messbare – Antikörpermengen in den Kulturüberständen nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte diese Arbeit die Vorteile des in der Literatur bereits beschriebenen Multiplex-FluoroSpot-Assays zeigen (Caspell und Lehmann, 2018), der die Detektion der einzelnen (Sub-) Klassen in einem einzigen Assay ermöglicht. Zur Gewinnung dieser Informationen müsste für jede (Sub-) Klasse ein eigener ELISA angesetzt werden. Zusätzlich erlaubt der FluoroSpot-Assay Rückschlüsse auf die Sekretionsleistung der einzelnen ASZ, sowie die Affinität der sezernierten Antikörper (Becza et al., 2024; Karulin und Lehmann, 2012), wohingegen der ELISA nur einen semiquantitativen und nicht qualitativen Nachweis darstellt. Wie bereits erwähnt ermöglicht die FluoroSpot-Plattform zusätzlich die Detektion von kreuzreaktiven Antikörpern (Lehmann et al., 2024).

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit untermauern – zusammen mit den im Text dargestellten Erkenntnissen weiterer Studien – die besonderen Vorteile und Bedeutung des FluoroSpot-Assays im Hinblick auf die Klärung immunologischer Fragestellungen.

#### 4.4 Limitationen und Ausblick

Diese Arbeit ist nach dem Kenntnisstand des Verfassers die Einzige, die die *In-vitro*-Stimulation mit *R848 + rIL-2* und *Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21* über mehrere Tage – in Bezug auf die Zellproliferation und Funktionalität der differenzierten ASZ – vergleicht. Durch den Pilotcharakter dieser Arbeit wurde nur ein kleines Patientenkollektiv untersucht, sodass eine Gegenüberstellung größerer Kohorten wünschenswert ist.

Für einzelne, der in dieser Arbeit untersuchten Zellspender, konnte eine große Anzahl IgM/A<sup>+</sup>-sezernierender ASZ an Tag 3 bei Stimulation mit *Stimulationsansatz 1* nachgewiesen werden, sodass eine Betrachtung früherer Zeitpunkte möglicherweise mehr Aufschluss über die Proliferation dieser ASZ liefern könnte.

*Marsman et al.* (2022) berichten von einem Anstieg der zu Plasmablasten differenzierten B-Lymphozyten zwischen Tag 6 und Tag 9, wohingegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten lassen, dass eine Verlängerung des Untersuchungszeitraumes über Tag 7 hinaus nicht sinnvoll ist, sodass diese konträren Ergebnisse weiterer Forschungsbestrebungen bedürfen. Zusätzlich konnte diese Arbeit – besonders anhand der IgE<sup>+</sup>-sezernierenden ASZ – bestätigen, dass die ruhenden B-Gedächtniszellen Zeit zur Differenzierung zu ASZ benötigen. Es ist bekannt, dass *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) zur Nachverfolgung von durch Lymphozyten durchlaufenen Zellteilungen verwendet werden kann (Lyons und Parish, 1994), sodass hiermit genauere Erkenntnisse bezüglich der Anzahl notwendiger Zellteilungen bis zur Differenzierung der B-Zellen zu ASZ erlangt werden können. Besonders ein Vergleich beider Stimulationsansätze bezüglich der notwendigen Zellteilungen bis zum Übergang der B-Gedächtniszellen ins Stadium der ASZ ist von großem wissenschaftlichen Interesse und würde tiefere Einblicke in die im Text erwähnte Rechtsverschiebung bei Verwendung von *Stimulationsansatz 2* ermöglichen.

Es ist nicht auszuschließen, dass der fehlende Nachweis IgG1-sezernierender ASZ bei einem der Zellspender zu geringen Verzerrungen der dargestellten Ergebnisse geführt hat, da dessen Daten nicht in die Statistik eingeflossen sind. Die fehlende Detektion lässt sich am ehesten durch einen Polymorphismus des sezernierten IgG1 erklären, der durch den polyklonalen Detektionsantikörper nicht erkannt oder nur mit einer niedrigaffinen Bindung durch ebendiesen gebunden wird. Die Vermutung eines Polymorphismus beruht auf der Beobachtung, dass an drei der fünf untersuchten Zeitpunkte eine geringe Anzahl IgG1-sezernierender ASZ für den Zellspender nachgewiesen werden konnten. Dieses Problem des Detektionssystems ist der Forschungsgruppe bekannt und wird in zukünftigen Forschungsvorhaben genauer untersucht werden.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsansätzen sind noch weitere Zytokine und Substanzen zur *In-vitro*-Stimulation beschrieben und etabliert worden (siehe 1.4 *In-vitro*-Stimulation), sodass ein Vergleich mit weiteren Stimulationsansätzen/-protokollen

wünschenswert ist. Auch sollten zukünftige Forschungsbestrebungen eine Testung gegenüber weiteren Antigenen fokussieren, da der FluoroSpot-Assay nicht nur im Rahmen der Erforschung von Infektionskrankheiten oder der MS sondern auch bei weiteren Autoimmunerkrankungen, wie dem Diabetes mellitus Typ 1 Verwendung findet (Powell et al., 2019).

Die für COVID-19-Impfungen gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit beschränken sich auf das NCAP- und S-Antigen des ursprünglichen *Wuhan-Hu-1*-Strangs. In Anbetracht weiterer Mutationen des SARS-CoV-2 sollte die hier vorgestellte Evaluation von Impfantworten an Antigenen neuerer Virusvarianten und zur Langzeituntersuchung der Effektivität der weltweiten Impfbestrebungen angewendet werden (Übersichtsartikel (Firouzabadi et al., 2023)). Auch wurden in dieser Arbeit keine Daten bezüglich des verwendeten mRNA-Impfstoffes und der möglichen Verwendung eines abweichenden Impfstoffes für die Booster-Impfungen erhoben.

Bezüglich der Etablierung eines FluoroSpot-Assays für MLC1 im Rahmen der MS-Forschung bedarf es weiterer Bestrebungen und einer größeren Kohorte, um abschließende Rückschlüsse ziehen zu können. Besonders ist aber die Möglichkeit, im FluoroSpot-Assay bis zu vier Immunglobulinklassen in einem Assay nachweisen zu können, hervorzuheben, da diese es ermöglicht, neben IgG<sup>+</sup>- auch die Rolle IgA<sup>+</sup>-sezernierender ASZ in der Pathogenese der MS weiter zu untersuchen.

Auch werden in der Literatur noch eine Vielzahl weiterer potenzieller Antigenstrukturen der B-Zell-vermittelten Autoimmunität in der MS beschrieben (Kuerten et al., 2020), so dass eine Erweiterung des Antigenpanels und der Vergleich der MS-Kohorte mit Patienten mit anderen inflammatorischen Erkrankungen des ZNS weiterführende Erkenntnisse liefern könnte. In dem Zusammenhang sind auch – wie bereits in Abschnitt 4.2.2 *Multiple Sklerose* beschrieben – weitere Untersuchungen bezüglich einer möglichen Kreuzreaktivität der sezernierten Antikörper und daraus ableitbaren Rückschlüssen auf das Erkrankungsrisiko und die Schwere einer MS wünschenswert.

## 5. Zusammenfassung

Bedingt durch die Komplexität der menschlichen Immunantwort ist diese in ihrer Gesamtheit *in vitro* nicht reproduzierbar, sodass im Zuge der B-Zell-Forschung im Laufe der Zeit verschiedene *In-vitro*-Stimulationsprotokolle vorgestellt worden sind. Durch die große Inhomogenität dieser Protokolle werden – je nach Literatur – unterschiedliche Zeitangaben für die notwendige Stimulationsdauer der ruhenden B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmablasten aufgeführt.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden zwei dieser *In-vitro*-Stimulationsprotokolle über einen Stimulationszeitraum von 3 - 11 Tagen verglichen, um den optimalen Zeitpunkt für die Durchführung eines FluoroSpot-Assays zu bestimmen. Hierbei wurden nicht nur die Immunglobulinklassen bzw. -subklassen ausgewertet, sondern auch ein besonderes Augenmerk auf die Evaluation von antigenreaktiven Immunglobulinen gelegt.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten aufzeigen, dass bei *In-vitro*-Stimulation mit *R848 + rIL-2* eine Stimulationsdauer von 4 - 5 Tagen und bei Verwendung von *Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21* von 5 - 6 Tagen zu bevorzugen sind, da nach dieser Zeitspanne – unabhängig von der untersuchten Immunglobulinklasse/-subklasse – die größte Anzahl an Antikörper-sezernierenden Zellen im Kulturmedium vorhanden ist.

Nach Evaluation des optimalen Untersuchungszeitpunktes wurden die Erkenntnisse in der klinischen Forschung angewendet und die Immunantwort auf COVID-19-Impfungen untersucht. Hierbei konnte die Notwendigkeit der *In-vitro*-Stimulation vor Durchführung eines FluoroSpot-Assays demonstriert werden. Bezüglich der Booster-Impfungen konnte kein signifikanter Anstieg der IgG<sup>+</sup>-sezernierenden Zellen detektiert werden.

Im Rahmen der Multiplen Sklerose gelang erstmalig die Etablierung eines FluoroSpot-Assays für MLC1, ein Antigen, für das erst kürzlich eine mögliche Verbindung mit der Erkrankung nachgewiesen werden konnte. Diese gewonnenen Erkenntnisse können somit als Grundlage für weitere Forschungsbestrebungen bezüglich der Rolle von MLC1 in der Pathogenese der Multiplen Sklerose dienen, die sich dem FluoroSpot-Assay zur Evaluation autoimmunreaktiver B-Zellen als Werkzeug bedienen.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung der B-Lymphozyten und <i>In-vitro</i> -Stimulation	19
Abbildung 2: Funktionsschema des FluoroSpot-Assays	22
Abbildung 3: Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen antigenspezifischen FluoroSpot-Assay	40
Abbildung 4: Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen Pan-IgM/G/A/E <sup>+</sup> bzw. IgG1/G2/G3/G4 FluoroSpot-Assay	41
Abbildung 5: Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen antigenspezifischen IgG-ELISA	45
Abbildung 6: Schematisches Layout einer Mikrotiterplatte für einen Pan-IgG/E-ELISA	47
Abbildung 7: <i>In-vitro</i> -Stimulation mit R848 + rIL-2	49
Abbildung 8: <i>In-vitro</i> -Stimulation mit Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21	50
Abbildung 9: Vergleich der Kinetik der IgM <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ	52
Abbildung 10: Vergleich der Kinetik der IgG <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ	54
Abbildung 11: IgG-Konzentration in den Zellkulturüberständen im zeitlichen Verlauf	55
Abbildung 12: Vergleich der Kinetik der IgG-Subklassen-sezernierenden ASZ	58
Abbildung 13: Vergleich der Kinetik der IgA <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ	60
Abbildung 14: Kinetik der IgE <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ bei <i>In-vitro</i> -Stimulation mit Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-21	61
Abbildung 15: IgE-Konzentration in den Zellkulturüberständen im zeitlichen Verlauf	63
Abbildung 16: Vergleich des Anteils antigenreaktiver IgG <sup>+</sup> -sezernierender ASZ an der Gesamtheit der IgG <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ	64
Abbildung 17: Vergleich der zwei <i>In-vitro</i> -Stimulationsansätze im Hinblick auf den Anteil antigenreaktiver IgG <sup>+</sup> -sezernierender ASZ	66
Abbildung 18: Antigenreaktives IgG in den Zellkulturüberständen	67
Abbildung 19: FluoroSpot-Assay nach COVID-19-Impfung ( <i>ex vivo</i> ) und <i>In-vitro</i> -Stimulation mit R848 + rIL-2	70
Abbildung 20: FluoroSpot-Assay zur Bestimmung der Häufigkeit von IgM/G/A/E <sup>+</sup> -sezernierenden ASZ nach COVID-19-Impfung oder Rekonvaleszenz	71
Abbildung 21: Vergleich der Antigenreaktivität gegenüber SARS-CoV-2-Antigenen	73

Abbildung 22: Vergleich der Antigenreaktivität gegenüber GlialCAM, MLC1 und EBNA1 zwischen gesunden Probanden und MS-Erkrankten

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunglobulinklassen und deren Eigenschaften	17
Tabelle 2: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	25
Tabelle 3: <i>Coating</i> -Antikörper	29
Tabelle 4: Detektionsantikörper	30
Tabelle 5: Antigene	31
Tabelle 6: Puffer und Lösungen	32
Tabelle 7: Weitere Substanzen	33
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 9: Technische Geräte	36
Tabelle 10: Sekundäre und tertiäre Detektionsantikörper-Lösungen	44

## 8. Literaturverzeichnis

Afkhami S, D'Agostino MR, Zhang A, Stacey HD, Marzok A, Kang A, Singh R, Bavananthasivam J, Ye G, Luo X, Wang F, Ang JC, Zganiacz A, Sankar U, Kazhdan N, Koenig JFE, Phelps A, Gameiro SF, Tang S, Jordana M, Wan Y, Mossman KL, Jeyanathan M, Gillgrass A, Medina MFC, Smaill F, Lichty BD, Miller MS, Xing Z. Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. *Cell*. 2022; 185: 896-915 e819

Ahmed R, Gray D. Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. *Science*. 1996; 272: 54-60

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006; 124: 783-801

Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteché CM, Simoneaux DK, Fanslow WC, Belmont J, Spriggs MK. CD40 Ligand Gene Defects Responsible for X-Linked Hyper-IgM Syndrome. *Science*. 1993; 259: 990-993

Amato MP, Derfuss T, Hemmer B, Liblau R, Montalban X, Soelberg Sorensen P, Miller DH, Group EFW. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016 ECTRIMS focused workshop. *Mult Scler*. 2018; 24: 590-603

Avery DT, Ma CS, Bryant VL, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Fulcher DA, Cook MC, Tangye SG. STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood*. 2008; 112: 1784-1793

Becza N, Liu Z, Chepke J, Gao XH, Lehmann PV, Kirchenbaum GA. Assessing the Affinity Spectrum of the Antigen-Specific B Cell Repertoire via ImmunoSpot(®). *Methods Mol Biol*. 2024; 2768: 211-239

Bednarski E, Del Rio Estrada PM, DaSilva J, Boukadida C, Zhang F, Luna-Villalobos YA, Rodríguez-Rangel X, Pitén-Isidro E, Luna-García E, Díaz Rivera D, López-Sánchez DM, Tapia-Trejo D, Soto-Nava M, Astorga-Castañeda M, Martínez-Moreno JO, Urbina-Granados GS, Jiménez-Jacinto JA, Serna Alvarado FJ, Enriquez-López YE, López-Arellano O, Reyes-Teran G, Bieniasz PD, Avila-Rios S, Hatzioannou T. Antibody and Memory B-Cell Immunity in a Heterogeneously SARS-CoV-2-Infected and -Vaccinated Population. *mBio*. 2022; 13: e0084022

Bende RJ, van Maldegem F, Triesscheijn M, Wormhoudt TA, Guijt R, van Noesel CJ. Germinal centers in human lymph nodes contain reactivated memory B cells. *J Exp Med*. 2007; 204: 2655-2665

Bergqvist P, Stensson A, Lycke NY, Bemark M. T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *J Immunol*. 2010; 184: 3545-3553

Berkowska MA, Heeringa JJ, Hajdarbegovic E, van der Burg M, Thio HB, van Hagen PM, Boon L, Orfao A, van Dongen JJ, van Zelm MC. Human IgE(+) B cells are derived from T cell-dependent and T cell-independent pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134: 688-697 e686

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *J Exp Med*. 2000; 192: 1545-1552

Brieva JA, Roldán E, Rodríguez C, Navas G. Human tonsil, blood and bone marrow in vivo-induced B cells capable of spontaneous and high-rate immunoglobulin secretion in vitro: Differences in the requirements for factors and for adherent and bone marrow stromal cells, as well as distinctive adhesion molecule expression. *Eur J Immunol*. 1994; 24: 362-366

Budeus B, Kibler A, Kuppers R. Human IgM-expressing memory B cells. *Front Immunol*. 2023; 14: 1308378

Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev*. 2021; 303: 72-82

Capdevila-Nortes X, Lopez-Hernandez T, Apaja PM, Lopez de Heredia M, Sirisi S, Callejo G, Arnedo T, Nunes V, Lukacs GL, Gasull X, Estevez R. Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an MLC1 chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: 4405-4416

Caspell R, Lehmann PV. Detecting all Immunoglobulin Classes and Subclasses in a Multiplex 7 Color ImmunoSpot® Assay. In: Kalyuzhny AE, Hrsg. *Handbook of ELISPOT : Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York, 2018: 85-94

Chakraborty S, Gonzalez J, Edwards K, Mallajosyula V, Buzzanco AS, Sherwood R, Buffone C, Kathale N, Providenza S, Xie MM, Andrews JR, Blish CA, Singh U, Dugan H, Wilson PC, Pham TD, Boyd SD, Nadeau KC, Pinsky BA, Zhang S, Memoli MJ, Taubenberger JK, Morales T, Schapiro JM, Tan GS, Jagannathan P, Wang TT. Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nat Immunol.* 2021; 22: 67-73

Chaplin DD. Overview of the immune response. *JACI.* 2010; 125: 3-23

Chisari CG, Sgarlata E, Arena S, Toscano S, Luca M, Patti F. Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review. *J Neurol.* 2022; 269: 159-183

Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR. T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J Immunol.* 2004; 173: 68-78

Crotty S, Aubert RD, Glidewell J, Ahmed R. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods.* 2004; 286: 111-122

Czerkinsky CC, Nilsson L-Å, Nygren H, Ouchterlony Ö, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 109-121

Dahl JR, Weier A, Winter C, Hintze M, Rothhammer V, Tsaktanis T, Proebstel AK, Neziraj T, Poessnecker E, Oechtering J, Kuhle J, Kallmann BA, Lubber G, Heider T, Klotz L, Chunder R, Kuerten S. Modulator of VRAC Current 1 Is a Potential Target Antigen in Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2025; 12: e200374

Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, Nakao C, Rayaprolu V, Rawlings SA, Peters B, Krammer F, Simon V, Saphire EO, Smith DM, Weiskopf D, Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021; 371: eabf4063

de Haan CA, Rottier PJ. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2005; 64: 165-230

Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW, Geha RS. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol*. 2004; 16: 395-404

Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol*. 2013; 190: 1827-1836

Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*. 2019; 26: 27-40

Dugan HL, Stamper CT, Li L, Changrob S, Asby NW, Halfmann PJ, Zheng NY, Huang M, Shaw DG, Cobb MS, Erickson SA, Guthmiller JJ, Stovicek O, Wang J, Winkler ES, Madariaga ML, Shanmugarajah K, Jansen MO, Amanat F, Stewart I, Utset HA, Huang J, Nelson CA, Dai YN, Hall PD, Jedrzejczak RP, Joachimiak A, Krammer F, Diamond MS, Fremont DH, Kawaoka Y, Wilson PC. Profiling B cell immunodominance after SARS-CoV-2 infection reveals antibody evolution to non-neutralizing viral targets. *Immunity*. 2021; 54: 1290-1303 e1297

Ecker JW, Kirchenbaum GA, Pierce SR, Skarlupka AL, Abreu RB, Cooper RE, Taylor-Mulneix D, Ross TM, Sautto GA. High-Yield Expression and Purification of Recombinant Influenza Virus Proteins from Stably-Transfected Mammalian Cell Lines. *Vaccines*. 2020; 8: 462

Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ, Lipsky PE. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol*. 2005; 175: 7867-7879

Favre-Kontula L, Rolland A, Bernasconi L, Karmirantzou M, Power C, Antonsson B, Boschert U. GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia*. 2008; 56: 633-645

Fecher P, Caspell R, Naeem V, Karulin AY, Kuerten S, Lehmann PV. B Cells and B Cell Blasts Withstand Cryopreservation While Retaining Their Functionality for Producing Antibody. *Cells*. 2018; 7:

Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*. 1990; 9: 516-524

Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect*. 2022; 28: 202-221

Firouzabadi N, Ghasemiyeh P, Moradishooli F, Mohammadi-Samani S. Update on the effectiveness of COVID-19 vaccines on different variants of SARS-CoV-2. *Int Immunopharmacol*. 2023; 117: 109968

Ford H. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med (Lond)*. 2020; 20: 380-383

Franke F, Kirchenbaum GA, Kuerten S, Lehmann PV. IL-21 in Conjunction with Anti-CD40 and IL-4 Constitutes a Potent Polyclonal B Cell Stimulator for Monitoring Antigen-Specific Memory B Cells. *Cells*. 2020; 9:

Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol*. 1991; 147: 8-13

Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, Pagani M, Abrignani S. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin Immunol*. 2013; 25: 252-262

Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, Gouma S, Hicks P, Meng W, Rosenfeld AM, Dysinger S, Lundgreen KA, Kuri-Cervantes L, Adamski S, Hicks A, Korte S, Oldridge DA, Baxter AE, Giles JR, Weirick ME, McAllister CM, Dougherty J, Long S, D'Andrea K, Hamilton JT, Betts MR, Luning Prak ET, Bates P, Hensley SE, Greenplate AR, Wherry EJ. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals after mRNA vaccination. *ci. Immunol.* 2021; 6: eabi6950

Good KL, Tangye SG. Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2007; 104: 13420-13425

Hajnik RL, Plante JA, Liang Y, Alameh MG, Tang J, Bonam SR, Zhong C, Adam A, Scharon D, Rafael GH, Liu Y, Hazell NC, Sun J, Soong L, Shi PY, Wang T, Walker DH, Sun J, Weissman D, Weaver SC, Plante KS, Hu H. Dual spike and nucleocapsid mRNA vaccination confer protection against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in preclinical models. *Sci Transl Med.* 2022; 14: eabq1945

Halliley JL, Kyu S, Kobie JJ, Walsh EE, Falsey AR, Randall TD, Treanor J, Feng C, Sanz I, Lee FE. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine.* 2010; 28: 3582-3587

Hammarlund E, Thomas A, Amanna IJ, Holden LA, Slayden OD, Park B, Gao L, Slifka MK. Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nat Commun.* 2017; 8: 1781

Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, Peleg AY, Boo I, Drummer HE, Hogarth PM, O'Hehir RE, van Zelm MC. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol.* 2020; 5: eabf8891

Hasbold J, Corcoran LM, Tarlinton DM, Tangye SG, Hodgkin PD. Evidence from the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms regulate lymphocyte differentiation. *Nat Immunol.* 2004; 5: 55-63

Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant.* 2012; 12: 1784-1792

Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, Ahlborg N. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods.* 2013; 391: 50-59

Jahnmatz P, Sundling C, Yman V, Widman L, Asghar M, Sonden K, Stenstrom C, Smedman C, Ndungu F, Ahlborg N, Farnert A. Memory B-Cell Responses Against Merozoite Antigens After Acute Plasmodium falciparum Malaria, Assessed Over One Year Using a Novel Multiplexed FluoroSpot Assay. *Front Immunol.* 2020; 11: 619398

Jimenez-Saiz R, Ellenbogen Y, Bruton K, Spill P, Sommer DD, Lima H, Wasserman S, Patil SU, Shreffler WG, Jordana M. Human BCR analysis of single-sorted, putative IgE(+) memory B cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 144: 336-339 e336

Jose-Cascon MS, de la Varga-Martinez R, Campos-Caro A, Rodriguez C. Dynamics of B-Cell Responses after SARS-CoV-2 Vaccination in Spain. *Vaccines.* 2022; 10:

Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D, Klein B. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood.* 2009; 114: 5173-5181

Karahan GE, Eikmans M, Anholts JD, Claas FH, Heidt S. Polyclonal B cell activation for accurate analysis of pre-existing antigen-specific memory B cells. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177: 333-340

Karulin AY, Lehmann PV. How ELISPOT Morphology Reflects on the Productivity and Kinetics of Cells' Secretory Activity. In: Kalyuzhny AE, Hrsg. *Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press, 2012: 125-143

Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2015; 28: 193-205

Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J Exp Med.* 1998; 188: 1679-1689

Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H, Hrsg. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Cham (CH)2015: 161-167

Köppert S. Membranbeschichtung mit einem Affinitätsmarker ermöglicht die verlässliche Detektion von antigenspezifischen B-Zellen in ImmunoSpot-Assays. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Medizinische Fakultät. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), 2022

Köppert S, Wolf C, Becza N, Sautto GA, Franke F, Kuerten S, Ross TM, Lehmann PV, Kirchenbaum GA. Affinity Tag Coating Enables Reliable Detection of Antigen-Specific B Cells in Immunospot Assays. *Cells.* 2021; 10: 1843

Kotov DI, Kotov JA, Goldberg MF, Jenkins MK. Many Th Cell Subsets Have Fas Ligand-Dependent Cytotoxic Potential. *J Immunol.* 2018; 200: 2004-2012

Kuerten S, Lanz TV, Lingampalli N, Lahey LJ, Kleinschnitz C, Mäurer M, Schroeter M, Braune S, Ziemssen T, Ho PP, Robinson WH, Steinman L. Autoantibodies against central nervous system antigens in a subset of B cell-dominant multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117: 21512-21518

Kuerten S, Pommerschein G, Barth SK, Hohmann C, Milles B, Sammer FW, Duffy CE, Wunsch M, Rovituro DM, Schroeter M, Addicks K, Kaiser CC, Lehmann PV. Identification of a B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood. *J Clin Immunol.* 2014; 152: 20-24

Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* 2018; 48: 202-213

Kyu SY, Kobie J, Yang H, Zand MS, Topham DJ, Quataert SA, Sanz I, Lee FE-H. Frequencies of human influenza-specific antibody secreting cells or plasmablasts post vaccination from fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2009; 340: 42-47

Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon J-S, Jude KM, Fernandez D, Fernandes RA, Gomez AM, Nadj G-S, Bartley CM, Schubert RD, Hawes IA, Vazquez SE, Iyer M, Zuchero JB, Teegen B, Dunn JE, Lock CB, Kipp LB, Cotham VC, Ueberheide BM, Aftab BT, Anderson MS, DeRisi JL, Wilson MR, Bashford-Rogers RJM, Platten M, Garcia KC, Steinman L, Robinson WH. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*. 2022; 603: 321-327

Lawrence MG, Woodfolk JA, Schuyler AJ, Stillman LC, Chapman MD, Platts-Mills TA. Half-life of IgE in serum and skin: Consequences for anti-IgE therapy in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139: 422-428 e424

Lehmann PV, Liu Z, Becza N, Valente AV, Wang J, Kirchenbaum GA. Monitoring Memory B Cells by Next-Generation ImmunoSpot((R)) Provides Insights into Humoral Immunity that Measurements of Circulating Antibodies Do Not Reveal. *Methods Mol Biol*. 2024; 2768: 167-200

Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020; 5: 562-569

Li Y, Mateu E, Diaz I. Impact of Cryopreservation on Viability, Phenotype, and Functionality of Porcine PBMC. *Front Immunol*. 2021; 12: 765667

Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, Hu J-L, Xu W, Zhang Y, Lv F-J, Su K, Zhang F, Gong J, Wu B, Liu X-M, Li J-J, Qiu J-F, Chen J, Huang A-L. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020; 26: 1200-1204

Lopez-Hernandez T, Ridder MC, Montolio M, Capdevila-Nortes X, Polder E, Sirisi S, Duarri A, Schulte U, Fakler B, Nunes V, Scheper GC, Martinez A, Estevez R, van der Knaap MS. Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am J Hum Genet.* 2011; 88: 422-432

Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994; 171: 131-137

Mankarious S, Lee M, Fischer S, Pyun KH, Ochs HD, Oxelius VA, Wedgwood RJ. The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med.* 1988; 112: 634-640

Marsman C, Verhoeven D, Koers J, Rispens T, Ten Brinke A, van Ham SM, Kuijpers TW. Optimized Protocols for In-Vitro T-Cell-Dependent and T-Cell-Independent Activation for B-Cell Differentiation Studies Using Limited Cells. *Front Immunol.* 2022; 13: 815449

Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9: 4-9

Mingari MC, Gerosa F, Carra G, Accolla RS, Moretta A, Zubler RH, Waldmann TA, Moretta L. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature.* 1984; 312: 641-643

Moens L, Tangye SG. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol.* 2014; 5: 65

Monzon-Posadas WO, Zorn J, Peters K, Baum M, Proksch H, Schluter CB, Menting T, Pusnik J, Streeck H. Longitudinal monitoring of mRNA-vaccine-induced immunity against SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2023; 14: 1066123

Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie.* 9. Auflage ed.: Springer Berlin Heidelberg, 2018

Nanan R, Heinrich D, Frosch M, Kreth HW. Acute and long-term effects of booster immunisation on frequencies of antigen-specific memory B-lymphocytes. *Vaccine*. 2001; 20: 498-504

Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016; 60: 275-301

Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 160-171

Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol*. 2004; 173: 5361-5371

Pape KA, Dileepan T, Kabage AJ, Kozysa D, Batres R, Evert C, Matson M, Lopez S, Krueger PD, Graiziger C, Vaughn BP, Shmidt E, Rhein J, Schacker TW, Khoruts A, Jenkins MK. High-affinity memory B cells induced by SARS-CoV-2 infection produce more plasmablasts and atypical memory B cells than those primed by mRNA vaccines. *Cell Rep*. 2021; 37: 109823

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001; 357: 1777-1789

Peng Y, Du N, Lei Y, Dorje S, Qi J, Luo T, Gao GF, Song H. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *EMBO J*. 2020; 39: e105938

Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *JACI*. 2013; 131: 959-971

Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol*. 2009; 39: 1260-1270

Powell WE, Hanna SJ, Hocter CN, Robinson E, Lewis M, Dunseath G, Luzio S, Howell A, Dayan CM, Wong FS. Detecting autoreactive B cells in the peripheral blood of people with type 1 diabetes using ELISpot. *J Immunol Methods*. 2019; 471: 61-65

Pröbstel A-K, Zhou X, Baumann R, Wischnewski S, Kutza M, Rojas OL, Sellrie K, Bischof A, Kim K, Ramesh A, Dandekar R, Greenfield AL, Schubert RD, Bisanz JE, Vistnes S, Khaleghi K, Landefeld J, Kirkish G, Liesche-Starnecker F, Ramaglia V, Singh S, Tran EB, Barba P, Zorn K, Oechtering J, Forsberg K, Shioh LR, Henry RG, Graves J, Cree BAC, Hauser SL, Kuhle J, Gelfand JM, Andersen PM, Schlegel J, Turnbaugh PJ, Seeberger PH, Gommerman JL, Wilson MR, Schirmer L, Baranzini SE. Gut microbiota-specific IgA<sup>+</sup> B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. *Sci Immunol*. 2020; 5: eabc7191

Ramachandran H, Laux J, Moldovan I, Caspell R, Lehmann PV, Subbramanian RA. Optimal Thawing of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Use in High-Throughput Human Immune Monitoring Studies. *Cells*. 2012; 1: 313-324

Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Förster R, Cyster JG. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*. 2002; 416: 94-99

Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, Poewe W, Berger T. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain*. 1999; 122 ( Pt 11): 2047-2056

Reyes RA, Clarke K, Gonzales SJ, Cantwell AM, Garza R, Catano G, Tragus RE, Patterson TF, Bol S, Bunnik EM. SARS-CoV-2 spike-specific memory B cells express higher levels of T-bet and FcRL5 after non-severe COVID-19 as compared to severe disease. *PLoS One*. 2021; 16: e0261656

Rodda LB, Morawski PA, Pruner KB, Fahning ML, Howard CA, Franko N, Logue J, Eggenberger J, Stokes C, Golez I, Hale M, Gale M, Jr., Chu HY, Campbell DJ, Pepper M. Imprinted SARS-CoV-2-specific memory lymphocytes define hybrid immunity. *Cell*. 2022; 185: 1588-1601 e1514

Rojas OL, Probstel AK, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, Lee DSW, Galicia G, Ramaglia V, Ward LA, Leung LYT, Najafi G, Khaleghi K, Garcillan B, Li A, Besla R, Naouar I, Cao EY, Chiaranunt P, Burrows K, Robinson HG, Allanach JR, Yam J, Luck H, Campbell DJ, Allman D, Brooks DG, Tomura M, Baumann R, Zamvil SS, Bar-Or A, Horwitz MS, Winer DA, Mortha A, Mackay F, Prat A, Osborne LC, Robbins C, Baranzini SE, Gommerman JL. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. 2019; 176: 610-624 e618

Scholzen A, Nahrendorf W, Langhorne J, Sauerwein RW. Expansion of IgG<sup>+</sup> B-cells during mitogen stimulation for memory B-cell ELISpot analysis is influenced by size and composition of the B-cell pool. *PLoS One*. 2014; 9: e102885

Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, Hemmings O, O'Byrne A, Kouphou N, Galao RP, Betancor G, Wilson HD, Signell AW, Winstone H, Kerridge C, Huettner I, Jimenez-Guardeño JM, Lista MJ, Temperton N, Snell LB, Bisnauthsing K, Moore A, Green A, Martinez L, Stokes B, Honey J, Izquierdo-Barras A, Arbane G, Patel A, Tan MKI, O'Connell L, O'Hara G, MacMahon E, Douthwaite S, Nebbia G, Batra R, Martinez-Nunez R, Shankar-Hari M, Edgeworth JD, Neil SJD, Malim MH, Doores KJ. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol*. 2020; 5: 1598-1607

Shah HB, Smith K, Wren JD, Webb CF, Ballard JD, Bourn RL, James JA, Lang ML. Insights From Analysis of Human Antigen-Specific Memory B Cell Repertoires. *Front Immunol*. 2018; 9: 3064

Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. *Immunity*. 1998; 8: 363-372

Song G, He WT, Callaghan S, Anzanello F, Huang D, Ricketts J, Torres JL, Beutler N, Peng L, Vargas S, Cassell J, Parren M, Yang L, Ignacio C, Smith DM, Voss JE, Nemazee D, Ward AB, Rogers T, Burton DR, Andrabi R. Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection. *Nat Commun*. 2021; 12: 2938

Spivak AM, Sydnor ER, Blankson JN, Gallant JE. Seronegative HIV-1 infection: a review of the literature. *AIDS*. 2010; 24: 1407-1414

Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8: 199-205

Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 261-292

Sun P, Crum-Cianflone NF, Defang G, Williams M, Ganesan A, Agan BK, Lalani T, Whitman T, Brandt C, Burgess TH. Evaluation of T and B memory cell responses elicited by the pandemic H1N1 vaccine in HIV-infected and HIV-uninfected individuals. *Vaccine*. 2017; 35: 6103-6111

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*. 2000; 100: 655-669

Terlutter F, Caspell R, Nowacki TM, Lehmann A, Li R, Zhang T, Przybyla A, Kuerten S, Lehmann PV. Direct Detection of T- and B-Memory Lymphocytes by ImmunoSpot(R) Assays Reveals HCMV Exposure that Serum Antibodies Fail to Identify. *Cells*. 2018; 7:

Thomas OG, Bronge M, Tengvall K, Akpinar B, Nilsson OB, Holmgren E, Hessa T, Gafvelin G, Khademi M, Alfredsson L, Martin R, Guerreiro-Cacais AO, Grönlund H, Olsson T, Kockum I. Cross-reactive EBNA1 immunity targets alpha-crystallin B and is associated with multiple sclerosis. *Science Advances*. 2023; 9: eadg3032

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintore M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018; 17: 162-173

van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol*. 2020; 11: 760

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014; 5: 520

Vietzen H, Kuhner LM, Berger SM, Furlano PL, Bsteh G, Berger T, Rommer P, Puchhammer-Stockl E. Accumulation of Epstein-Barr virus-induced cross-reactive immune responses is associated with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2024; 134:

Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020; 26: 1816-1821

Weber MS, Hemmer B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 239-245

Weinstein JS, Herman EI, Lainez B, Licona-Limon P, Esplugues E, Flavell R, Craft J. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol.* 2016; 17: 1197-1205

Weiss GE, Ndungu FM, McKittrick N, Li S, Kimani D, Crompton PD, Marsh K, Pierce SK. High efficiency human memory B cell assay and its application to studying *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in natural infections. *J Immunol Methods.* 2012; 375: 68-74

Weskamm LM, Fathi A, Raadsen MP, Mykytyn AZ, Koch T, Spohn M, Friedrich M, Group M-M-SS, Haagmans BL, Becker S, Sutter G, Dahlke C, Addo MM. Persistence of MERS-CoV-spike-specific B cells and antibodies after late third immunization with the MVA-MERS-S vaccine. *Cell Rep Med.* 2022; 3: 100685

WHO, 2020: WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Zugriffsdatum: 07. Juli 2025)

Winklmeier S, Eisenhut K, Taskin D, Rübsamen H, Gerhards R, Schneider C, Wratil PR, Stern M, Eichhorn P, Keppler OT, Klein M, Mader S, Kümpfel T, Meinl E. Persistence of functional memory B cells recognizing SARS-CoV-2 variants despite loss of specific IgG. *iScience.* 2022; 25:

Wolf C, Köppert S, Becza N, Kuerten S, Kirchenbaum GA, Lehmann PV. Antibody Levels Poorly Reflect on the Frequency of Memory B Cells Generated following SARS-CoV-2, Seasonal Influenza, or EBV Infection. *Cells*. 2022; 11: 3662

Wrammert J, Koutsonanos D, Li G-M, Edupuganti S, Sui J, Morrissey M, McCausland M, Skountzou I, Hornig M, Lipkin WI, Mehta A, Razavi B, Del Rio C, Zheng N-Y, Lee J-H, Huang M, Ali Z, Kaur K, Andrews S, Amara RR, Wang Y, Das SR, O'Donnell CD, Yewdell JW, Subbarao K, Marasco WA, Mulligan MJ, Compans R, Ahmed R, Wilson PC. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med*. 2011; 208: 181-193

Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng N-Y, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008; 453: 667-671

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382: 727-733

## 9. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurde im Institut für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Bonn, sowie bei Cellular Technology Limited (CTL, Shaker Heights, Ohio, USA) unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Stefanie Kürten durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Sebastian Köppert, Dr. Greg A. Kirchenbaum, Prof. Dr. Paul V. Lehmann und Prof. Dr. Stefanie Kürten.

Die Planung und Durchführung der Versuche sowie die Datenerhebung und -analyse erfolgte nach Einarbeitung durch Dr. Greg A. Kirchenbaum durch Dr. Sebastian Köppert mit Unterstützung durch Dr. Carla Wolf. An der Durchführung der Versuche am Universitätsklinikum Bonn war auch Philip Blunck beteiligt. Frau Dr. Carla Wolf und Herr Blunck haben bei der Durchführung der Versuche wertvolle Hilfestellung bei zeitsensitiven- und aufwendigen Arbeitsschritten, wie dem Ansetzen der Zellkulturen, dem Waschen der Mikrotiterplatten oder der Herstellung bzw. Applikation der verwendeten Reagenzien geleistet.

Die statistische Auswertung und Erstellung der Schaubilder sowie Interpretation der Daten erfolgten eigenständig.

Ein Teil der in dieser Arbeit dargestellten Daten wurde bereits veröffentlicht. Dr. Sebastian Köppert hat die korrespondierende Experimente zu den unten aufgeführten, publizierten Schaubildern geplant, durchgeführt, die gewonnenen Daten analysiert und die Schaubilder erstellt. Folgende Daten und Schaubilder wurden durch Dr. Sebastian Köppert zur Publikation beigetragen: *Suppl. Figure 2, Suppl. Figure 3, Suppl. Figure 5, Suppl. Figure 9, Suppl. Table 1* (Reaktivität gegenüber dem S-Antigen in der Pre-COVID- und PCR-verified-Kohorte).

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

## 10. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Lehmann PV, Karulin AY, Becza N, Yao L, Liu Z, Chepke J, Maul-Pavicic A, Wolf C, **Köppert S**, Valente AV, Gorbachev AV, Tary-Lehmann M, Kirchenbaum GA. Theoretical and practical considerations for validating antigen-specific B cell ImmunoSpot assays. *J Immunol Methods*. 2025: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2025.113817>

## 11. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich gebührend bei Prof. Dr. Paul V. Lehmann und Dr. Greg A. Kirchenbaum bedanken, die mich eindrucksvoll und voller Begeisterung in die Welt der Immunologie eingeführt haben und mir nicht nur während meiner Zeit bei *Cellular Technology Limited*, sondern auch darüber hinaus immer mit einem offenen Ohr und wertvollen Ratschlägen zur Seite standen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Stefanie Kürten für die freundliche Überlassung des Themas, die überaus hilfsbereite und unermüdliche Unterstützung, nicht nur bei der Realisierung des Aufenthaltes in den USA und der Durchführung der Experimente am Universitätsklinikum Bonn, sondern auch bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dr. Carla Wolf und allen Mitarbeitern von *Cellular Technology Limited* gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und die unvergessliche Zeit, die ich in diesem Team verbringen durfte.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie am Universitätsklinikum Bonn für die großartige Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente zur Multiplen Sklerose bedanken. Ich hatte eine sehr schöne und angenehme Zeit im Labor.

Abschließend möchte ich ein Dankeschön, das mir besonders am Herzen liegt, an meine Familie richten.

## 12. Publikationsliste

Lehmann PV, Karulin AY, Becza N, Yao L, Liu Z, Chepke J, Maul-Pavicic A, Wolf C, **Köppert S**, Valente AV, Gorbachev AV, Tary-Lehmann M, Kirchenbaum GA. Theoretical and practical considerations for validating antigen-specific B cell ImmunoSpot assays. *J Immunol Methods*. 2025: 113817.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2025.113817>

Wolf C, **Köppert S**, Becza N, Kuerten S, Kirchenbaum GA, Lehmann PV. Antibody Levels Poorly Reflect on the Frequency of Memory B Cells Generated following SARS-CoV-2, Seasonal Influenza, or EBV Infection. *Cells*. 2022; 11: 3662.

<https://doi.org/10.3390/cells11223662>

**Köppert S**, Wolf C, Becza N, Sautto GA, Franke F, Kuerten S, Ross TM, Lehmann PV, Kirchenbaum GA. Affinity Tag Coating Enables Reliable Detection of Antigen-Specific B Cells in Immunospot Assays. *Cells*. 2021; 10: 1843.

<https://doi.org/10.3390/cells10081843>