

Aus dem Institut für Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Etablierung einer methodischen Vorgehensweise
zur Konservierung humaner Immunzell-Proben für
die nachfolgende Analyse mittels Einzelzell-
Sequenzierung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2024

vorgelegt von:
Bianca Simella Becher
geb. am: 19.07.2000
in Kempten (Allgäu)

Tag der Promotion: 30.01.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hanning

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Berichterstatten: Prof. Dr. Markus Hoth

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Immunsystems	5
2.2 Immunzellen des peripheren Blutes	9
2.3 Dynamik der zellulären RNA-Expression	11
2.4 Veränderung der Expressionsrate bestimmter mRNAs im Rahmen der Immunaktivierung	12
2.5 Zielsetzung	14
3. Materialien	16
3.1 Laborgeräte	16
3.2. Chemikalien und Reagenzien	17
3.3 Sonstige Materialien	18
3.4 Software	18
4. Methodik	20
4.1 Gewinnung des Spenderblutes und Aufarbeitung der Blutproben	20
4.2 Isolation der PBMCs mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation	20
4.3 Bestimmung der Zellzahl	22
4.4 Kryokonservierung der Proben	22
4.5 Immunzell-Aktivierung	23
4.6 Methanol-Fixierung der PBMCs	25
4.7 Analyse der PBMC-Zeitverlaufsproben mittels Einzelzell-Sequenzierung (single-cell sequencing)	25
4.8 Bioinformatische Prozessierung zur Auswertung der Einzelzell- Sequenzierungsdaten	27
4.9 Zelluläre Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie	28
5. Ergebnisse	30
5.1 Überblick zur methodischen Vorgehensweise	30
5.2 Qualitative Kontrolle wichtiger Protokollschritte	32
5.2.1 Bestimmung des Anteils der vitalen Zellen nach der Kryokonservierung	32
5.2.2 Überprüfung der Effizienz des Aktivierungsstimulus	34
5.2.3 Überprüfung der qualitativen Parameter der finalen Einzelzell-Sequenzierung	36

5.3 Analyse von zelltyp-spezifischen Einzelzell-Expressionsmustern	40
5.3.1 Vergleich von zelltyp-spezifischen Markern und der resultierenden PBMC-Zelltyp-Zuordnung zum 0, 2, 4 und 8 h Zeitpunkt	41
5.3.2 Identifizierung der Gene mit den stärksten Zeitverlaufsveränderungen	44
6. Diskussion	47
6.1 Etablierung einer Methodik zur schrittweisen Verarbeitung von PBMCs	47
6.2 Identifizierung spezifischer Zelltypen mittels <i>in vitro</i> Aktivierung	50
6.3 Veränderung der Expressionsdaten zwischen den Zeitpunkten	52
6.4 Fazit und Ausblick	53
7. Literaturverzeichnis	55
8. Publikation	61
9. Danksagung	61
10. Lebenslauf	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptorkomplexes	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung eines Zytokinrezeptors (JAK/STAT-Weg)	8
Abbildung 3: Einteilung der aus der hämatopoetischen Stammzelle differenzierten Blutzellen	10
Abbildung 4: Schichtung einer Blutprobe vor und nach einer Dichtegradientenzentrifugation	21
Abbildung 5: Methodischer Überblick über die Isolierung und Aktivierung von PBMCs und zur anschließenden Analyse mittels Einzelzell-Sequenzierung	31
Abbildung 6: Anzahl der vitalen Zellen nach Kryokonservierung aller Spenderinnen	33
Abbildung 7 :Graphische Darstellung der Anteile an CD4+ und CD8+ Zellen der PBMCs	34
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Anteile der CD69+ Zellen im Verlauf über 8 Stunden	35
Abbildung 9: Geigenplot mit Merkmalen der Qualitätskontrolle (Beispielhaft Spenderin 1)	38
Abbildung 10: UMAP-Darstellung der PBMCs während der verschiedenen Zeitpunkte der Aktivierung (0, 2, 4 und 8h)	41
Abbildung 11: Expressionsverhältnis ausgewählter Marker von T-Helfer-Zellen während der verschiedenen Zeitpunkte der Aktivierung	42
Abbildung 12: Expressionsverhältnis bestimmter Gene während der Aktivierung	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte	16
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 3: Sonstige verwendete Materialien	18
Tabelle 4: Verwendete Softwares und Tools	19
Tabelle 5: Qualitative Parameter der Einzelzell-Sequenzierung unter Angabe von Referenzwerten der verwendeten Analyse-Software (Cell Ranger)	38

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ (Maßeinheit)	Mikro (10 ⁻⁶)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>BATF</i>	basic leucine zipper ATF-like
BCL	B cell lymphoma
BSA	bovine serum albumin
B-Zelle	B-Lymphozyten
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
<i>CAMK4</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
<i>CCNB2</i>	cyclin B2
CD +	Cluster of Differentiation Molekül (positiv)
cDNA	complementary DNA
C ₂ H ₂	Acetylene
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>CREMα</i>	cAMP responsive element modulator α
CTP	Cytosintriphosphat
DDT	DL-Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS/FBS	Fötales Kälberserum (fetal calf/bovine serum)
<i>FOXP3</i>	Forkhead-box-protein P3
g	Gramm
GEM	Gel bead in Emulsion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

HCT-116	Human colon cancer cell line (Zelllinie)
HEK293	Human Embryonic Kidney 293T (Zelllinie)
HepG2	Hepatocellular G2 (Zelllinie)
IFN	Interferone
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITK	Inducible T cell Kinase
JAK	Janus-Kinasen
LAT	Linker for activation of T Cells
Lck	Tyrosin-protein kinase
LPS	Lipopolysacchariden
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
miRNA	Micro-RNAs
<i>MIR155HG</i>	Mir155 Host Gene
ml	Milliliter
mRNA	Boten-(messenger) RNA
mTOR	Molecular target of rapamycin
n (Präfix)	Nano (10^{-9})
NF-κB	NF-kappaB (Nuclear factor kappa B)
<i>NFKB1</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NIH/3T3	embryonic mouse fibroblast cell line
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p	p-Wert (Signifikanzwert)
<i>p21</i>	Protein 21 (engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1)
<i>p57</i>	Protein 57 (engl. tumor protein p53)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential des Wasserstoffs (pondus hydrogenii)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
<i>RORC</i>	RAR-related orphan receptor C
prä-mRNA	precursor messenger ribonucleic acid
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomalen RNA
<i>S100B</i>	S100 calcium-binding protein B
scRNA-seq	Single cell transcriptome sequencing
SEM	Standardfehler (engl. standard error of the mean)
SH2	Src Homology 2
SLP	SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein
SSC	saline sodium citrate
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TFH	follikuläre T-Helferzellen
TFR	Transferrin Rezeptor
<i>TFRC</i>	Transferrin receptor-Gen
TGF- β	Transforming growth factor β
TH1	Typ-1-T-Helferzelle
TH2	Typ-2-T-Helferzellen
Th17	Typ-17-T-Helferzellen
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktoren
Tregs	regulatorische T-Helferzellen
tRNA	Transfer-RNA
<i>TSPAN33</i>	Tetraspanin 33

T-Zelle	T-Lymphozyten
TZR (engl. TCR)	T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor)
U	Unit
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UMIs	unique molecular identifiers
UTP	Uraciltriphosphat
ZAP	zeta-chain-associated protein kinase
ρ	Dichte (Rho)

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems machen die PBMCs (engl. peripheral blood mononuclear cells; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) aus. Dabei handelt es sich um im peripheren Blut zirkulierende Immunzellen mit nur einem einzelnen runden Zellkern [29]. Durch die Aktivierung von PBMCs findet die Lymphozyten Proliferation, eine Veränderung der exprimierten mRNA und eine veränderte Zytokin-Produktion statt [38]. Weitere Immunreaktionen bestehen beispielsweise in der vermehrten Produktion von Antikörper durch B-Zellen [22] und in der Phagozytose von pathogenen Antigenen durch dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen, welche diese daraufhin CD4+-T-Zellen präsentieren [15]. Die molekularbiologische Analyse der PBMCs bietet die Möglichkeit eines Einblickes in die komplexen Zusammenhänge immunologischer Signalketten und das Erkennen von Hinweisen auf immun-gekoppelte Veränderungen, welche zu Infektionen [1] und Erkrankungen wie Krebs [61] führen können. Für eine detaillierte Darstellung der immunologischen Vorgänge ist als neuste molekularbiologische Untersuchungsmethoden die Einzelzell-RNA-Sequenzierung besonders geeignet [1], wobei im Anschluss eine Zelltypbestimmung der heterogenen Zellprobe anhand zelltyp-spezifischer molekularer Marker vorgenommen werden kann. Insbesondere bei nur in geringer Anzahl vorkommenden molekularen Markern kann dies allerdings eine Herausforderung darstellen [47]. Durch die Aktivierung durch externe Stimuli werden zelltyp-spezifische Marker nachweislich vermehrt induziert [7]. Basierend darauf bestand ein zentrales Ziel dieser Arbeit in der Testung, ob eine zuvor erfolgte *in vitro* Aktivierung bei der Auswertung von Einzelzell-Sequenzierungsanalysen zuverlässiger auf die spezifischen Zelltypen rückschließen lässt.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden PBMCs aus dem peripher venösen Blut von vier exemplarischen Spenderinnen isoliert und eine *in vitro* Aktivierung mittels PMA und Ionomycin durchgeführt. Nach Analyse mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden die resultierenden Einzelzell-Daten den verschiedenen Zelltypen anhand spezifischer Marker zugeordnet und in Form von UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) Clustern visualisiert. In Folge der Aktivierung waren Größe und Definierbarkeit der verschiedenen Cluster ausgeprägter. Am Beispiel der T-Helfer-Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass spezifische Marker, wie beispielsweise der Transkriptionsfaktor BATF, nach Aktivierung eine Steigerung der Expression aufwiesen. Insgesamt konnte somit der Nutzen der Aktivierung von PBMCs für die Aufschlüsselung der Zelltypen bestätigt werden.

Um die komplexen Arbeitsabläufe zur Analyse von PBMC-Aktivierungsmustern für zukünftige PBMC-Aktivierungsstudien zu erleichtern, bestand ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit darin, ein Arbeitsprotokoll zu evaluieren, welches die Zwischenlagerung der Zellen nach definierten Arbeitsschritten vorsah. Nach der Isolation aus dem Blut wurden die PBMCs in ein DMSO-basiertes Kryomedium aufgenommen und zunächst als vitale Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Nach dem Auftauen und im Anschluss an die *in vitro* Aktivierung wurden die Zellproben mithilfe eines Methanol-basierten Verfahrens fixiert, um sie vor der Analyse mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung erneut zwischenlagern zu können. Ein wichtiger Bestandteil der Arbeit waren die regelmäßigen Qualitätskontrollen nach den einzelnen Zwischenlagerungen. So wurden nach Auftauen der kryokonservierten Zellen und nach Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau ein Anteil vitaler Zellen von mehr als 80 % ermittelt. Am Beispiel der T-Zellen, welche die größten Zellpopulation der PBMCs darstellen [38], konnte zudem mittels Fluoreszenzfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse die effektive Induktion des CD69 Oberflächenproteins nachgewiesen werden, welches als früher Marker des T-Zell-Aktivierungsprozesses gilt [84]. Außerdem konnte eine im Referenzbereich liegende Anzahl der CD4+ und CD8+ T-Zellen bestätigt werden. Nach dem letzten Schritt der Einzelzell-Sequenzierung wurde die Qualität der resultierenden Daten anhand bestimmter Parameter wie zum Beispiel dem Anteil der intrazellulären Reads, der Anzahl der detektierten Gene pro Zelle [25] und der Expression von mitochondrialen Genen [23] überprüft. Auf Grundlage des Anteils der mitochondrialen Gene sowie der empfohlenen Grenzwerte für Gene und UMIs pro Zelle musste insgesamt nur ein sehr geringer Anteil der untersuchten Einzelzellen von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen werden. Für die in die finalen Auswertungen eingeschlossenen Zellen, lagen sowohl die mediane Anzahl an Genen pro Zelle als auch die mediane Anzahl an UMIs pro Zelle in einem Bereich, der anhand von vorangegangenen Studien vergleichbaren Werten von frisch isolierten PBMCs entsprach [23][25][34].

Darüber hinaus konnten anhand der resultierenden Einzelzell-Daten veränderte Expressionsraten von Genen mit bezeichnender immunregulatorischer Funktion nachgewiesen werden. In Folge der *in vitro* Aktivierung konnte beispielsweise eine erhöhte Expressionsrate des *NFKB1* Gens nachgewiesen werden. Das zugehörige Genprodukt fungiert als zentraler Transkriptionsfaktor, der die vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen fördert [14]. Analog zu den durchflusszytometrischen Analysen, kann auf Grundlage der Expressionsdaten somit ebenfalls von der effektiven Induktion der Immunzellaktivierung ausgegangen werden.

Insgesamt kann auf Basis der hohen Zellvitalität, der erwartungsgemäßen Verteilung T-zellulärer Subtypen und anhand der Evaluierung der resultierenden Einzelzell-

Sequenzierungsdaten somit von der Eignung des zu testenden Versuchsprotokolls für die Analyse von PBMC-Einzelzell-Aktivierungsmustern ausgegangen werden.

1.2 Abstract

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) are an important component of the human immune system. These are immune cells circulating in the peripheral blood with only a single round cell nucleus [29]. The activation of PBMCs leads to a change in lymphocyte proliferation, a change in the expression of mRNA and a change in cytokine production [37]. Other immune responses include an increased antibody production by B cells [22] and the phagocytosis of pathogenic antigens by dendritic cells, monocytes, macrophages and B cells, which in the following present them to CD4⁺ T cells [15]. Molecular biological analysis of PBMCs offers the possibility of gaining insight into the complex interrelationships of immunological signalling chains and the recognition of indications of immune-linked changes that can lead to infections [1] and diseases such as cancer [60]. Single-cell RNA sequencing is the latest molecular biological examination method that is particularly suitable for a detailed representation of immunological processes [1], whereby the cell type of the heterogeneous cell sample can then be determined using cell-type-specific molecular markers. However, this can pose a challenge, especially when the number of molecular markers is low [46]. Activation by external stimuli has been shown to increase the induction of cell type-specific markers [7]. Based on this, a central aim of this work was to test whether previous *in vitro* activation can be used to more reliably infer the specific cell types when analysing single-cell sequencing analyses.

In the present study, PBMCs were isolated from the peripheral venous blood of four exemplary donors and activated *in vitro* using PMA and ionomycin. After analysis by single-cell RNA sequencing, the resulting single-cell data were assigned to the different cell types using specific markers and visualised in the form of UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) clusters. As a result of the activation, the size and definability of the different clusters were more pronounced. Using the example of T helper cells, it was also shown that specific markers, such as the transcription factor BATF, exhibited an increase in expression after activation. Overall, the benefit of activating PBMCs for the breakdown of cell types was thus confirmed. In order to facilitate the complex workflows for analysing PBMC activation patterns for future PBMC activation studies, a further aim of the present work was to evaluate a work protocol that provided for the intermediate storage of the cells after defined work steps. After isolation from the blood, the PBMCs were placed in a DMSO-based cryomedium and initially cryopreserved as vital cells in liquid nitrogen. After thawing and following *in vitro* activation, the cell samples were fixed using a methanol-based process so that they could be

temporarily stored again before being analysed using single-cell RNA sequencing. An important part of the work was the quality controls after the individual interim storages. After thawing the cryopreserved cells and staining the dead cells with trypan blue, a proportion of vital cells of more than 80 % was determined. Using the example of T cells, which represent the largest cell population of PBMCs [37], the effective induction of the CD69 surface protein, which is considered an early marker of the T cell activation process, was also demonstrated by means of fluorescence staining and subsequent flow cytometric analysis [83]. In addition, the number of CD4+ and CD8+ T cells was confirmed to be within the reference range. After the final step of single-cell sequencing, the quality of the resulting data was checked using certain parameters such as the proportion of intracellular reads, the number of genes detected per cell [25] and the expression of mitochondrial genes [23]. Based on the proportion of mitochondrial genes and the recommended limit values for genes and UMIs per cell, only a very small proportion of the individual cells examined had to be excluded from the subsequent analyses. For the cells included in the final analyses, both the median number of genes per cell and the median number of UMIs per cell were in a range that corresponded to comparable values of freshly isolated PBMCs based on previous studies [23][25][33].

In addition, the resulting single-cell data revealed altered expression rates of genes with significant immunoregulatory functions. As a result of *in vitro* activation, for example, an increased expression rate of the NFKB1 gene was detected. The associated gene product acts as a central transcription factor that promotes the increased release of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules [14]. Analogous to the flow cytometric analyses, the effective induction of immune cell activation can also be assumed on the basis of the expression data.

Overall, based on the high cell viability, the expected distribution of T-cell subtypes and the evaluation of the resulting single-cell sequencing data, it can be assumed that the experimental protocol to be tested is suitable for analysing PBMC single-cell activation patterns.

2. Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Immunsystems

Ein Leben lang wird der menschliche Körper Krankheitserreger wie Viren, Bakterien und Pilze, toxischen Substanzen und anderen Pathogenen ausgesetzt. Gleichzeitig findet in unseren Körpern eine stetige Veränderung der Zellen statt, die zu pathologischen Veränderungen und malignen Erkrankungen führen können. Für die Regulierung und Bekämpfung dieser Prozesse ist das menschliche Immunsystem verantwortlich. Im Allgemeinen unterscheidet man das unspezifische (angeborene) Immunsystem von einem spezifischen (erworbenen) Immunsystem [15]. Das angeborene Immunsystem richtet sich unspezifisch gegen alle körperfremden Materialien und Antigene, während das erworbene Immunsystem sich im Laufe des Lebens gegen spezifische Antigene spezialisiert und gezielt gegen diese vorgeht [15]. Generell kann das Immunsystem in zelluläre und humorale Komponenten eingeteilt werden [33]. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten und ihre ausgereifte Form, die Makrophagen, Mastzellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [33]. Die Hauptfunktion dieser Zellen ist zum einen die Phagozytose aller pathogenen Mikroorganismen und entarteten Zellen, zum anderen die Präsentation der enthaltenen molekularen Strukturen, als sogenannte Antigene, gegenüber den Zellen des spezifischen Immunsystems [33]. Als die zentralen Bestandteile des spezifischen Immunsystems zählen die T-Lymphozyten (T-Zellen) und die B-Lymphozyten (B-Zellen) [10]. Nach Aktivierung der naiven T-Zellen durch die Präsentation von Antigenen differenzieren diese entweder zu T-Helferzellen oder zu zytotoxischen T-Zellen, welche anhand ihrer Oberflächenproteine unterschieden werden können [28]. Die T-Helferzellen exprimieren CD4+ Proteine auf der Zelloberfläche, während die zytotoxischen T-Zellen CD8+ Oberflächenproteine aufweisen [28]. CD4+ T-Helferzellen differenzieren sich weiter zu unterschiedlichen Subtypen, die sich in ihren Aufgaben unterscheiden [9]. So produziert der Subtyp TH1 vermehrt IFN- γ , welches eine starke Aktivierung von Makrophagen auslöst [11]. Der Subtyp TH2 exprimiert vor allem IL-4 [9]. TH2 wird vorrangig bei Infektionen mit Parasiten und Würmern benötigt, da eine Entzündungsreaktion mit eosinophilen und basophilen Granulozyten und Mastzellen gefördert wird [11]. Eine erhöhte Expression von IL-17 wird durch den Subtyp Th17 initiiert [9]. IL-17 entfaltet seine Wirkung über Stromazellen, welche ihrerseits eine Zytokin Kaskade freisetzen, welche die Neutrophilenreifung im Knochenmark fördert [11]. Einen stimulierenden Einfluss auf den Klassenwechsel von IgG- Antikörpern haben follikuläre T-Helferzellen (TFH), womit sie die anderen T-Helferzellen jeweils in deren Funktion unterstützen können [9]. Ein weiterer Subtyp sind regulatorische T-Helferzellen (Tregs), welche anti-inflammatorische Zytokine wie TGF- β und IL-10 exprimieren [11]. B-

Zellen sind mit Verantwortlich für die Präsentation von Antigenen gegenüber den T-Zellen und bilden zudem nach Antigenkontakt und der Differenzierung zu Plasmazellen spezifische Antikörper (IgG, IgM, IgA, IgD und IgE), die gegen diese Antigene agieren können [15]. Für die Interaktion zwischen den einzelnen Zellen des Immunsystems sind eine Reihe von Rezeptoren notwendig: der MHC-I-Rezeptor, der MHC-II-Rezeptor und der T-Zell-Rezeptor (TZR; engl. T cell receptor, TCR) [33]. Bei den MHC-Molekülen (engl. Major Histocompatibility Complex) handelt es sich um Multi-Protein-Komplexe, die im Inneren der Zelle mit Antigenen beladen und an der Zelloberfläche präsentiert werden [66]. Auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers befinden sich MHC-I-Rezeptoren, die bei Befall der Zelle mit körperfremden Organismen oder bei Entartung die Antigene den CD8+-T-Zellen präsentieren und durch diese abgetötet werden [15]. MHC-II-Rezeptoren befinden sich auf Antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen), die durch Phagozytose suspekter Antigene aufgenommen haben und diese daraufhin CD4+-T-Zellen präsentieren [15]. Der TCR/CD3-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche der T-Lymphozyten kann sowohl mit MHC-I-Rezeptoren, als auch mit MHC-II-Rezeptoren interagieren, wobei der Rezeptorkomplex je nach T-Zelltyp durch die Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8 unterstützt wird [33].

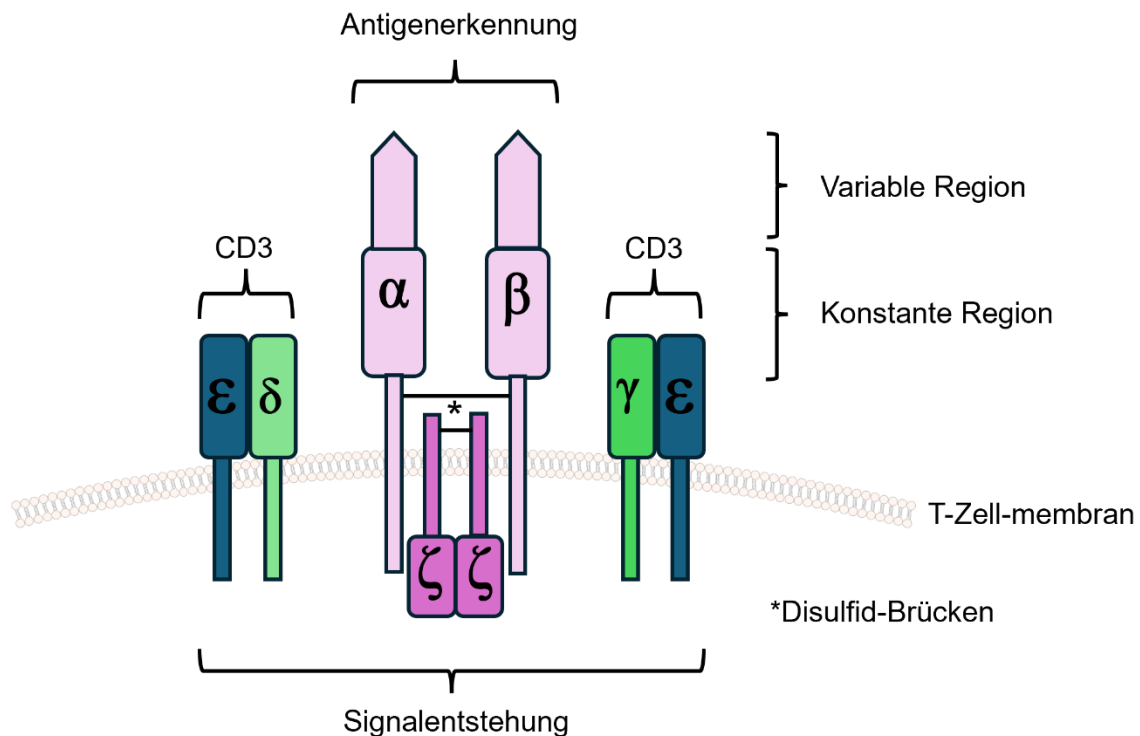


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptorkomplexes

Der membranständige TCR besteht aus einer Alpha- und Beta-Transmembrandomäne, welche mit einem Homodimer aus Zeta-Ketten und dem CD3-Korezeptor (bestehend aus einer Gamma- und einer Beta-Kette und zwei Epsilon-Ketten) assoziiert sind. Um verschiedene Antigene binden zu können, exprimiert der T-Zell-Rezeptor im Bereich der Alpha- und Beta- Untereinheiten einen variablen Bereich, der sich an das jeweilige Antigen anpasst. [11]

(Eigene Darstellung in Anlehnung an Sun Y, Li F, Sonnemann H, Jackson KR, Talukder AH, Katailaha AS, Lizee G. Evolution of CD8⁺ T Cell Receptor (TCR) Engineered Therapies for the Treatment of Cancer. *Cells*. 2021; 10(9):2379. Zugriff: <https://doi.org/10.3390/cells10092379>)

Nach der Aktivierung der zellulären Komponenten des Immunsystems können Immunzellen je nach Zelltyp bestimmte humorale Faktoren freisetzen, welche die Immunantwort unterstützen [22]. Dazu gehört die große Gruppe der Zytokine und die von B-Zellen produzierten Antikörper [22]. Die wichtigsten Zytokine bilden die Interleukine, die Chemokine, die Tumornekrosefaktoren (TNF) und die Interferone (IFN) [33]. Über die Zytokinrezeptoren wird die Wirkung der einzelnen Zytokine an die jeweiligen Zielzellen übermittelt [56].

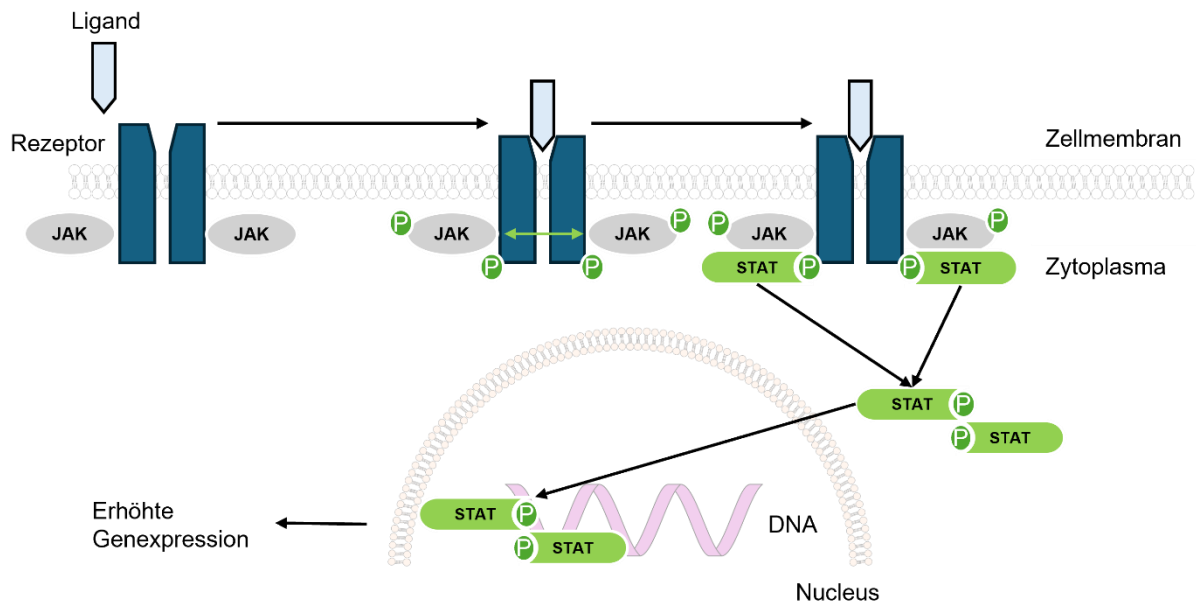


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung eines Zytokin-Rezeptors (JAK/STAT-Weg)

Nach Aktivierung des Rezeptors durch Zytokine werden mindestens zwei Ketten an der Zellmembran, welche Teil des Rezeptors sind, dimerisiert, wodurch zytoplasmatisch gebundene Janus-Kinasen (JAK) sich gegenseitig phosphorylieren können. Dies ermöglicht die Bindung von STAT-Proteinen an phosphorylierte Stellen des Rezeptors. Zuletzt lösen sich jeweils zwei phosphorylierte STAT-Proteine und bilden ein Dimer, welches als Transkriptionsfaktor dient und im Zellkern (Nucleus) nach Bindung an die DNA-Transkriptionsprozesse auslöst. Diese dienen im Folgenden zur Steuerung von Prozessen wie beispielsweise dem Zellwachstum. [32]

(Eigene Darstellung in Anlehnung an Hu, X., li, J., Fu, M. et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Sig Transduct Target Ther 6, 402 (2021). Zugriff: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>)

Da es eine Vielzahl an Zytokinen gibt, werden durch ihre stimulierende Wirkung viele verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert und viele unterschiedliche Wirkungen erzielt. Die Gruppe der Interferone Alpha und Beta lösen als die wichtigsten Effekte die Hemmung der Zellteilung und vermehrte Bildung von MHC-I-Proteinen aus, damit die infizierten Zellen sich nicht weiter teilen und durch das Immunsystem noch schneller erkannt und abgetötet werden können [64]. Interferon Gamma wird vorrangig durch T-Helfer-Zellen gebildet, fördert die Makrophagenaktivierung und die Lymphozyten Reifung [64]. Zu den Interleukinen zählen eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, welche über die Funktion als Wachstumsfaktoren,

die Stimulierung der Differenzierung von Immunzellen bis hin zu chemotaktischen Eigenschaften eine große Bandbreite an Aufgaben besitzen [64]. TNF-alpha ist einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren und sorgt für die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten zum Ort der Entzündung [64]. Durch die Aktivierung des Immunsystems wird also eine Kaskade an zellulären Interaktionen und die Freisetzung von humoralen Komponenten ausgelöst, die alle in einem komplexen Zusammenhang stehen.

2.2 Immunzellen des peripheren Blutes

Für die immunologische Überwachung des Körpers ist die Gruppe der PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; engl. peripheral blood mononuclear cells) zuständig. Es handelt sich dabei um Immunzellen, die im peripheren Blutsystem zirkulieren und nur einen einzelnen runden Zellkern besitzen [29]. Dazu gehören die Lymphozyten (70 bis 90 % der PBMCs), die Monozyten (10 bis 20 % der PBMCs) und die dendritischen Zellen (mit einem Anteil von 1 bis 2 % der PBMCs) [38]. In der Gruppe der Lymphozyten machen die CD3+ T-Lymphozyten mit 70 bis 85 % den größten Anteil aus, gefolgt von den B-Lymphozyten mit 5 bis 10 % und den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) mit 5 bis 20 % [38]. Periphere Lymphozyten sind vor dem Ablauf einer Immunreaktion entweder noch naive Lymphozyten, welche solange zwischen Blutsystem und Lymphsystem zirkulieren, bis ihnen ein Antigen präsentiert wird, oder Gedächtniszellen [38]. Bei den Gedächtniszellen handelt es sich um einen kleinen Teil der T-Effektorzellen und Plasmazellen (B-Zellen), die jahrelang im menschlichen Körper überleben und bei einer Reinfektion mit einem bereits bekannten Erreger eine deutlich schnellere Immunreaktion in Gang setzen können [15]. Wenn also keine Immunreaktion stattfindet, ruhen diese Zellen und üben keine Aktivität aus [15]. Sobald aber eine Immunreaktion gestartet wird, spielen diese Zellen eine wichtige Rolle, indem sie sich im Falle einer naiven Zelle weiter differenzieren oder im Falle einer Gedächtniszelle reaktiviert werden und mit mehr Härte gegen den Erreger vorgehen können [38]. Nur wenige Immunzellen im peripheren Blut sind wie die Gedächtniszellen auf ein einziges Antigen spezialisiert, viel mehr findet häufig eine polyklonale Aktivierung der Immunzellen statt [38]. Das bedeutet, dass viele verschiedene Antigene eine Immunreaktion bei der gleichen Zelle auslösen können [38]. Als Folge der Aktivierung dieser Zellgruppe kann eine Veränderung der Lymphozyten Proliferation, eine Veränderung der exprimierten mRNA und eine veränderte Zytokin-Produktion festgestellt werden [38].

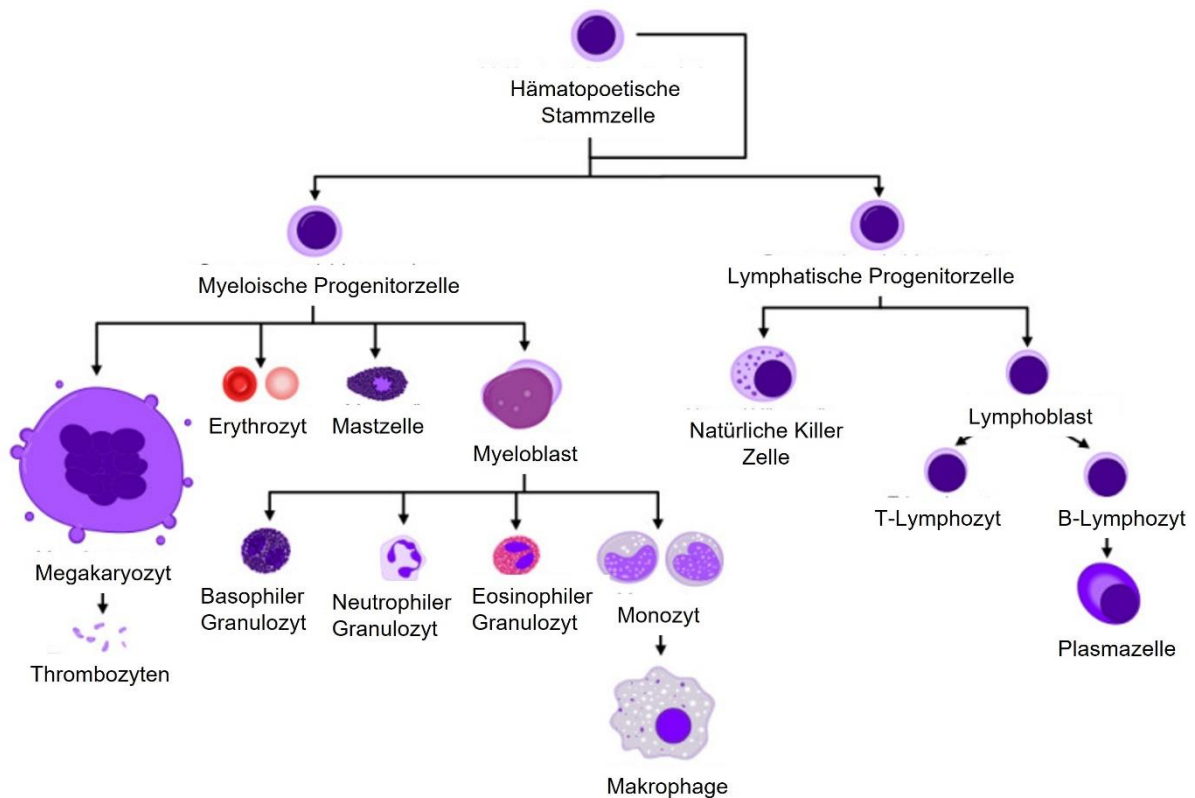


Abbildung 3: Einteilung der aus der hämatopoetischen Stammzelle differenzierten Blutzellen

Hämatopoetische Stammzellen differenzieren sich zu verschiedenen Vorläuferzellen, aus denen wiederum die verschiedenen Zelltypen entstehen können. Dazu gehören die lymphatischen Progenitorzellen, aus denen die Lymphozyten entstehen und die myeloischen Progenitorzellen, aus denen alle anderen Blutzellen differenziert werden. Zu den PBMCs gehören die Lymphozyten, die dendritische Zellen und die Monozyten. Alle anderen Zellarten haben entweder mehrere Kerne wie die Granulozyten oder sind kernlos wie die Erythrozyten und Thrombozyten, welche aus Megakaryozyten entstehen.

(Modifiziert nach Chennamadhavuni A, Lyengar V, Mukkamalla SKR, et al. Leukemia. [Updated 2023 Jan 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [Figure, Simplified hematopoiesis Contributed By A. Rad and M. Häggström.] Zugriff: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/figure/article-24207.image.f5/>)

2.3 Dynamik der zellulären RNA-Expression

Für die gerichtete Funktion aller Zellen, auch den Immunzellen, bilden spezifische molekulare Abläufe die Grundlagen, wobei die RNA eine zentrale Rolle beinhaltet. Im Allgemeinen handelt es sich bei der RNA um eine einzelsträngige Kopie unserer DNA, die zu unterschiedlichen Zwecken genutzt werden kann und dementsprechend unterschiedliche Namen trägt. Die Abkürzung mRNA steht für die sogenannte messenger RNA, welche als kodierende Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid; RNA) die genetische Information vom Zellkern in das Cytosol der Zelle transportiert und dort zur Herstellung von Proteinen dient [60]. Bei weiteren Arten von RNAs handelt es sich zum Beispiel um die Transfer-RNA (tRNA), welche der Zelle bei der Proteinsynthese an den Ribosomen im Zytoplasma dient [48], oder der ribosomalen RNA (rRNA) als Bestandteil der Ribosomen [69]. Die Synthese jeder Art von RNA anhand einer DNA-Matrize wird als Transkription bezeichnet [26]. Der Ablauf der Herstellung einer RNA im Rahmen einer Transkription kann in 3 Phasen eingeteilt werden: die Initiation, die Elongation, der eigentliche Schritt der Synthese und die Termination [63]. Benötigt wird für diesen Vorgang ein Enzym, die sogenannte DNA-abhängige RNA-Polymerase, den Anteil der DNA, von dem eine Kopie erstellt werden soll und die Nukleosidtriphosphate ATP, GTP, CTP und UTP als Substrate [81]. Anhand der Basenpaarungsregel (Adenin-Thymin(DNA)/Uracil(RNA); Cytosin-Guanin) kann eine Kopie der Basen des abgelesenen Matrizenstranges der DNA erstellt werden [60]. Im Falle der mRNA wird zunächst ein Vorläufermolekül gebildet. Die Sequenz der prä-mRNA setzt sich dabei sowohl aus Exons, die für die Aminosäuren des Proteins kodieren, als auch aus nicht-kodierenden Introns zusammen [63]. Zur weiteren Reifung werden die Introns enzymatisch aus der prä-mRNA-Sequenz herausgeschnitten (Splicing) [63]. Die übriggebliebenen Exons werden weiter prozessiert, indem dem 5'-Ende der RNA eine CAP-Struktur und dem 3'-Ende der RNA ein Polyadenylat-Schwanz hinzugefügt wird, welche der mRNA die nötige Stabilität verleihen [59]. Hierbei handelt es sich nun um die reife mRNA, die den Zellkern verlassen kann und an einem rauen endoplasmatischen Retikulum im Zellplasma die benötigte Basensequenz für die Herstellung eines Proteins (Translation) präsentieren kann [71]. In der Zelle kann durch verschiedene Faktoren Einfluss auf die Genexpression genommen werden, da die Zelle auf molekularer Ebene auf äußere Einflüsse reagieren können muss [62]. Bestimmte Gene müssen dauerhaft exprimiert werden, da sie zum Beispiel für den Basisstoffwechsel des Körpers kodieren [60]. Die Transkription vieler anderer Gene muss nur in bestimmten Situationen durch externe Stimuli aktiviert oder bei sonst dauerhafter Transkription gezielt gehemmt werden [60]. Einen aktivierenden oder hemmenden Effekt besitzen Transkriptionsfaktoren, die an die DNA binden und Ko-Aktivatoren oder RNA-Polymerasen aktivieren können [43]. Unter anderem durch Wachstumssignale, hormonelle Signale, Neurotransmitter oder Zytokine werden diese

produziert und aktiviert [62]. Eine weitere Regulierung findet durch die Methylierung der DNA statt, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert und die Chromatinstruktur der Promotorregion bestimmter Gene verändert werden kann [55]. Einen weiteren hemmenden regulatorischen Einfluss besitzt die große Gruppe der nicht-kodierenden Micro-RNAs (miRNA), welche bestimmte mRNA-Abschnitte erkennen kann, wodurch die Translation dieser Proteine gehemmt wird [5]. Diese regulatorischen Abläufe können bei Erkrankungen und malignen Prozessen fehlerhaft verlaufen.

2.4 Veränderung der Expressionsrate bestimmter mRNAs im Rahmen der Immunaktivierung

Im vorherigen Abschnitt „Aufbau und Funktion des menschlichen Immunsystems“ wurde bereits auf den Aufbau des T-Zell-Rezeptors eingegangen. Anhand der Aktivierung einer T-Zelle durch den T-Zell-Rezeptor kann exemplarisch der Zusammenhang zwischen Aktivierung des Immunsystems und der Expression von bestimmter mRNA dargestellt werden. Über den MHC-Komplex werden kleine Peptidfragmente eines Antigens den T-Zellen präsentiert, bis es mit einer T-Zelle in Kontakt kommt, die einen passenden T-Zell-Rezeptor exprimiert [15]. Die CD4/CD8 Proteine legen fest, mit welchen MHC-Komplex die T-Zelle interagieren kann [15]. So binden T-Zellen mit einem CD4+ Oberflächenprotein nur an MHC-II-Rezeptoren und CD8+ T-Zellen an MHC-I-Rezeptoren [15]. Als weiteres kostimulatorisches Signal wird der CD28/B7-Komplex benötigt, der durch das CD28 Protein auf der T-Zelle und dem B7-Rezeptor auf der antigenpräsentierenden Zelle gebildet wird [22]. Falls der CD28/B7-Komplex nicht vorliegt, wird die T-Zelle durch die antigenpräsentierende Zelle nicht aktiviert, sondern inaktiviert [22]. Dies dient als Sicherheitsmechanismus, der überschießende Immunreaktionen verhindern soll [22].

Die Untereinheit des T-Zell-Rezeptors besteht meistens aus Alpha und Beta Heterodimere, nur ein kleiner Teil der T-Zell-Rezeptoren trägt stattdessen eine Gamma und Delta Untereinheit, wobei deren genaue Funktion noch nicht bekannt ist [57]. Nach Bindung mit einem MHC-Peptid-Komplex findet eine Konformationsänderung vor allem im Bereich der CD3-Schleife statt [57]. Durch Tyrosinkinasen werden Teile des CD3-Komplexes (sogenannte ITAM-Sequenzen (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)) phosphoryliert, wodurch Signalproteine mit SH2-Domäne an diese Sequenz binden können [58]. Bei der Tyrosinkinase handelt es sich um die Lck- Kinase, die vor der Aktivierung des TCR in einem nicht vollständig

aktivierten Zustand vorliegt, wodurch eine autonome und unkontrollierte Aktivierung der T-Zelle verhindert wird [58]. An die phosphorylierten ITAM-Sequenzen bindet im nächsten Schritt die Tyrosinkinase ZAP-70, wodurch diese in Reichweite von Lck gebracht, phosphoryliert und somit aktiviert wird [58]. Durch die Aktivierung der Tyrosinkinase ZAP-70 kommt es wiederum zur Phosphorylierung des Transmembranproteins LAT und des Adapterproteins SLP-76, welche anschließend einen Multiproteinkomplex bilden und so verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden induzieren [9]. Als Resultat werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die unter anderem die Expression von zelltyp-spezifischen Zytokinen regulieren. Zu den Genen, die durch die Aktivierung transkribiert werden, gehört beispielsweise das Gen für IL-2, welches zur weiteren Aktivierung von Lymphozyten und NK-Zellen führt [9]. Zudem werden verschiedene Signalwege aktiv, die unter anderem zur Steigerung der zellulären Adhäsionsfähigkeit, der Proliferationsrate und des zellulären Stoffwechsels dienen [9]. Die vier Signalwege laufen über die Initiierung von Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K), Proteinkinase B (PKB), Proteinkinase C (PKC) und Inducible T cell Kinase (ITK) [9]. Beispielsweise wird über PI3K der mTOR-Signalweg gestartet, welcher den Zellstoffwechsel ankurbelt, was für die Immunantwort entscheidend ist [9]. Dies hat neben der Steigerung von Lipidproduktion auch eine erhöhte mRNA-Synthese und im Anschluss eine erhöhte Translation zur Folge [58]. Bestimmte mRNAs werden durch die Aktivierung einer T-Zelle deutlich mehr produziert, um die Immunreaktion zu induzieren. In B-Zellen findet ein ähnlicher Ablauf statt, wenn diese über ihren B-Zell-Rezeptor, bei dem es sich um membranständige IgM und IgD Antikörper handelt, aktiviert werden [58]. Auch hier spielt die erhöhte Transkription von Genen und dadurch die vermehrte Anzahl an mRNAs im Zellkern eine wichtige Rolle [58]. Die Aktivierung der NK-Zellen findet über deren TLR4-Rezeptoren durch das Lipid A von Lipopolysaccharid-Molekülen statt [37]. Dadurch wird der NF- κ B-Signalweg initiiert und die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst [37]. Dendritische Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche die Rezeptoren Toll-like receptor 7 (TLR7) und Toll-like receptor 9 (TLR9), welche die Einzelstrang RNA von viralen Erregern binden kann [20]. Durch diese Aktivierung werden vermehrt Typ 1 Interferone gebildet [20]. Monozyten werden über das Binden von pathogenen Oberflächenstrukturen an ihre Toll-like-Rezeptoren aktiviert, wobei der Transkriptionsfaktor NF κ B (Nukleäre Faktor κ B) für die proinflammatorischen Gene eine wichtige Rolle spielt [33]. Insgesamt wird deutlich, dass das menschliche Immunsystem seine Immunantwort auf pathogene Antigene verstärkt, indem es die Produktion von Proteinen deutlich erhöht, die während einer Phase ohne benötigter Immunantwort in deutlich niedrigeren Zahlen vorliegen.

2.5 Zielsetzung

Als Teil von wissenschaftlichen Studien werden PBMCs unter anderem untersucht, um wichtige Hinweise auf immun-gekoppelte Veränderungen zu gewinnen [1], die zu Infektionen [1], aber auch zur komplexen Pathogenese von Erkrankungen wie Krebs oder Parkinson beitragen [61][46]. Als eine der neusten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden bietet die Einzelzell-RNA-Sequenzierung die Möglichkeit detaillierte Einblicke in die zugehörigen immunologischen Signalketten zu erlangen [1]. Bei der Untersuchung von heterogenen Zellproben, wie den PBMCs, findet im Anschluss an die eigentliche Sequenzierungsanalyse die Zuordnung der enthaltenen Zelltypen mittels bioinformatischer Auswertung statt. Dabei wird die Zelltypbestimmung der, in der Probe enthaltenen, Einzelzellen auf Grundlage des Vorhandenseins von spezifischen molekularen Markern vorgenommen. Eine möglichst genaue Zelltypbestimmung ist für die Auswertung von entsprechenden Einzelzell-Datensätzen von größter Bedeutung [61]. Dies kann jedoch eine Herausforderung darstellen, wenn die charakteristischen Gene nur in geringem Maße exprimiert sind [47].

Im Falle der PBMCs können durch die Aktivierung dieser Immunzellen durch externe Stimuli nachweislich Signalkaskaden induziert werden, die zu einer verstärkten Expression von zelltyp-spezifischen molekularen Markern führen [7]. Auf Grundlage dessen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet werden, ob eine zuvor erfolgte *in vitro* Aktivierung genutzt werden kann, um bei der Auswertung von Einzelzell-Sequenzierungsanalysen zuverlässiger auf die spezifischen Zelltypen rückzuschließen. Dazu sollten PBMCs aus dem peripher venösen Blut von vier exemplarischen Spenderinnen gewonnenen und *in vitro* aktiviert werden. Nach Analyse der Zeitverlaufsproben mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung sollten anschließend die Expressionsdaten von zelltypischen Genen und von Genen mit bezeichnender immunregulatorischer Funktion zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten vor (0 h) und nach der Stimulation (2, 4, 8 h) verglichen werden.

Im Hinblick auf die komplexen Arbeitsabläufe zur Analyse von PBMC-Aktivierungsmustern sollte gleichzeitig ein Versuchsprotokoll getestet werden, bei dem die Zellproben nach definierten Arbeitsschritten zwischengelagert werden können. Die Unterteilung in einzelne Schritte könnte die Etablierung künftiger PBMC-Aktivierungsstudien erleichtern, indem aufwendige Teilprozesse nicht direkt aufeinander folgend (engl. *fast-forward*) durchgeführt werden müssen.

Das zu testende Versuchsprotokoll setzte sich aus den folgenden Teilschritten zusammen:

- Schritt 1: Nach Isolation aus dem Blut wurden die Zellproben zunächst kryokonserviert und in vitalem Zustand zwischengelagert.
- Schritt 2: Nach dem Auftauen der Zellen und erfolgter Induktion der Immunzellaktivierung wurden die resultierenden Zeitverlaufsproben (0, 2, 4, und 8 h) mithilfe eines Methanol-basierten Verfahrens fixiert und erneut zwischengelagert.
- Schritt 3: Zum Schluss wurden die Zellproben rehydriert, bevor die finalen Analysen mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung angeschlossen wurden.

Um zu überprüfen, ob anhand des oben beschriebenen Protokolls eine ausreichend hohe Probenqualität erwartet werden kann, sollte nach dem Auftauen der kryokonservierten Zellen, der prozentuale Anteil der vitalen Zellen gegenüber den toten Zellen ermittelt werden. Dazu sollten die PBMC-Proben im Anschluss an den ersten Protokoll-Schritt mittels zellulärer Zählung und unter Trypan-Blau-Färbung der abgestorbenen Zellen untersucht werden. Nach dem zweiten Protokoll-Schritt sollte exemplarisch für die T-Zellen (CD4+ und CD8+), welche die größte Subpopulation der PBMCs darstellen, die Effektivität der Zeitverlaufsaktivierung verifiziert werden. Dazu sollte die Expression des CD69 Oberflächenproteins, das als Marker für die Induktion des frühen T-Zell-Aktivierungsprozesses gilt [84], mittels Fluoreszenzfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse nachgewiesen werden. Im Anschluss an den dritten Protokollschritt sollten zudem verschiedene qualitative Parameter der resultierenden Daten ausgewertet werden. Als wichtige Kriterien für eine gute Qualität der Einzelzell-Sequenzierungsdaten sollten dabei unter anderem der Anteil der intrazellulären Reads und die Anzahl der detektierten Gene pro Zelle überprüft werden [25].

3. Materialien

3.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Flockeneisbereiter Flake-Line	WESSAMAT Eismaschinenfabrik GmbH	Kaiserslautern, Deutschland
Haake L Wasserbad mit D8 Thermostat	Thermo Haake GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Heraeus Laminair HB 2448 K Sterilbank	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge 5418 R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
New Brunswick Incubator CO2 Galaxy 170S (PBMC-Zellkultur)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Nikon Eclipse TS100 Mikroskop	Nikon Europe BV	Amsterdam, Niederlande
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie 2T	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge 5810R mit Ausschwing-Rotor A-4-44	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

3.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
2-Propanol/Isopropanol (ROTISOLV $\geq 99,95\%$)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
bovine serum albumin (BSA), pH 7, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich	St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Dichtegradienten-Medium (Pancoll human (p): 1,077 g/ml)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (fetal calf/bovine serum; FCS/FBS; superior)	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Gibco™ DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA,Vereinigte Staaten
Gibco™ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Zellkulturmedium	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA,Vereinigte Staaten
Gibco™ Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA,Vereinigte Staaten
Ionomycin	Sigma-Aldrich	St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Methanol ROTISOLV®	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Nuklease freies Wasser (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific Inc	Waltham, MA,Vereinigte Staaten
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich	St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Steriles Wasser	B. Braun Melsungen SE	Melsungen, Deutschland

3.3 Sonstige Materialien

Tabelle 3: Sonstige verwendete Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
25 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Axygen™ 200 µl-Universal-Pipettenspitzen (Wide Bore)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, Vereinigte Staaten
Heathrow Scientific Handzähler	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, Vereinigte Staaten
Zählkammern/Hämacytometer (Incyto X50, Disposable, INCYTO C-Chip; Improved Neubauer; Volumen: 10 µL)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, Vereinigte Staaten
Kryogefäße Cryo.S (2 ml)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatten (24-well)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, Vereinigte Staaten
Pipetten (Eppendorf Research plus; 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl und 100-1000 µl)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (Multiguard Barrier Tips; 10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl)	Sorenson Bioscience, Inc.	Salt Lake City, Utah, Vereinigte Staaten
Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (Safe-lock; 1,5 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
S-Monovette®, Blutentnahme-Röhrchen mit Lithium-Heparin	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland

3.4 Software

Für die Erstellung der Arbeit wurde das Textverarbeitungsprogramm „Microsoft Office Word“ verwendet. Abbildungen und Tabellen wurden mit Hilfe von „Microsoft Office PowerPoint“ und „Microsoft Office Excel“ erstellt. Für die Übersetzung der deutschen Zusammenfassung wurde unterstützend DeepL.com angewandt.

Zur Verwaltung der Literatur-Referenzen wurde das Programm „Zotero“ genutzt.

In der folgenden Tabelle findet sich eine Auflistung aller benutzten Software und deren Entwickler.

Tabelle 4: Verwendete Softwares und Tools

Software	Entwickler
Micorsoft Office Word	Microsoft Office Home and Student; Microsoft Corporation
Microsoft Office Powerpoint	Microsoft Office Home and Student; Microsoft Corporation
Microsoft Office Excel	Microsoft Office Home and Student; Microsoft Corporation
Zotero	Corporation for Digital Scholarship; Roy Rosenzweig Center of History and New Media at George Mason University
Powerpoint-Toolkit	Motifolio Inc.
DeepL.com	DeepL SE

4.Methodik

4.1 Gewinnung des Spenderblutes und Aufarbeitung der Blutproben

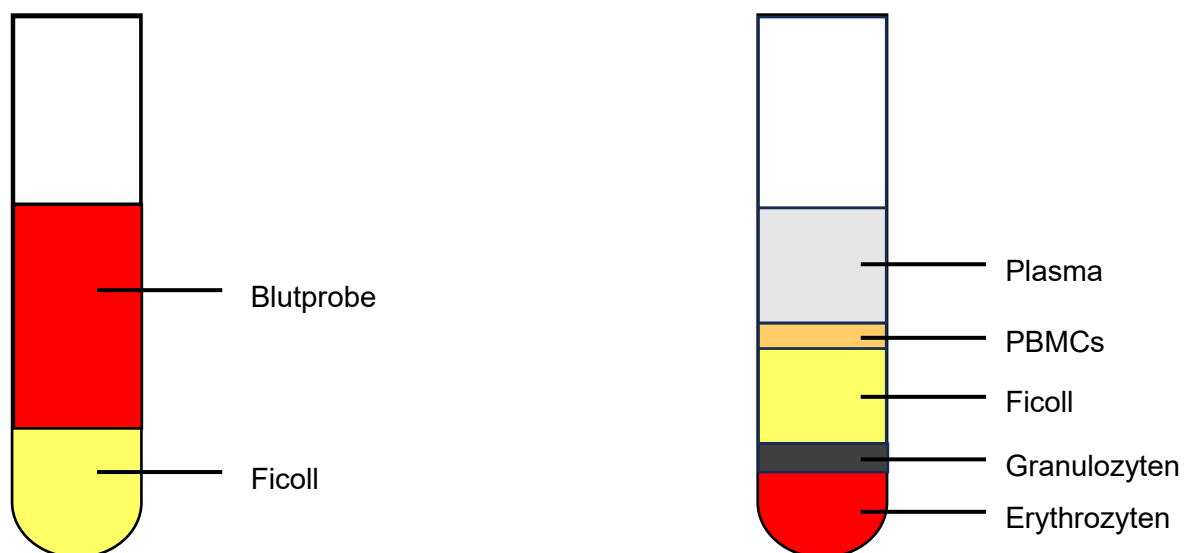
Als Grundlage der Versuche wurde von vier jungen und gesunden Probandinnen (Spenderin 1,2,3 und 4; weiblich und 22 Jahre alt) peripher venöses Blut gespendet. Dabei wurden pro Spenderin insgesamt 27 Milliliter (ml) Blut in Blutröhrchen mit Heparin-Lithium zur Antikoagulation abgenommen. Das abgenommene Blut wurde direkt weiterverarbeitet. Die Einwilligung der Spenderinnen wurde nach erfolgter Aufklärung in schriftlicher Form festgehalten. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die Ethikkommission der Universität des Saarlandes bewilligt (Ethikantrag mit der Nummer 48/22).

4.2 Isolation der PBMCs mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

Das entnommene Blut wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS auf 35 ml aufgefüllt. Bei PBS (aus dem engl: Phosphate buffered saline) handelt es sich um eine Phosphat-gepufferte Salzlösung, welche den pH-Wert und den osmotischen Druck der vitalen Zellen konstant hält und dadurch das Überleben der Zellen erleichtert [85]. Zudem ist die Pufferlösung nicht toxisch und ideal zur Verdünnung von Blut [85].

In dem nun vorliegenden Blut-PBS-Gemisch befanden sich nicht nur die gewünschten PBMCs, sondern auch weitere Blutbestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Blutplasma. Für die Extraktion der PBMCs wurde die unterschiedliche Dichte der einzelnen Zelltypen genutzt [51]. Dafür wurde das Blut-PBS-Gemisch auf eine Ficoll-Schicht in einem Falcon pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass sich die Blutschicht nicht direkt mit der Ficoll-Schicht vermischte [51]. Bei Ficoll handelt es sich um ein synthetisches Polymer aus Saccharose, welches eine Molekül-Dichte von 1,077 g/ml besitzt [86]. Zellen mit einer höheren Dichte können die Ficoll-Schicht durchwandern [86]. Dazu gehören die Erythrozyten und Granulozyten im Vollblut [51]. Erythrozyten besitzen eine mittlere Dichte von 1,100 g/ml [51]. Bei den Granulozyten variiert die mittlere Dichte je nach Subtyp [51]. Die Basophilen Granulozyten haben die geringste Dichte mit 1,079 g/ml, gefolgt von den Neutrophilen Granulozyten mit 1,082 g/ml und die Eosinophilen Granulozyten besitzen mit 1,092 g/ml die höchste mittlere Dichte aller Granulozyten [51]. Im Gegensatz dazu haben PBMCs eine geringere Dichte, weshalb sich diese Zellgruppe oberhalb der Ficoll-Schicht ansammelt [86].

Die mittlere Dichte der Lymphozyten beträgt 1,070 g/ml, die der Monozyten 1,065 g/ml [51]. Oberhalb der PBMC-Schicht findet sich das Plasma mit den Thrombozyten, welches eine mittlere Dichte von 1,026 besitzt [51]. Die Trennung der Blutbestandteile wird durch die anschließende Zentrifugation erreicht. Für 25 min wurden die Proben bei 1.800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und im Anschluss ohne Bremse auslaufen gelassen, um die entstandenen Schichten nicht zu vermischen. Um die gewünschten PBMCs zu extrahieren, wurde die PBMC-Schicht vorsichtig extrahiert. Als nächster Schritt wurden die gewonnenen PBMCs zweimal mit PBS gewaschen und dabei für jeweils 6 min zentrifugiert. Um auch alle Erythrozyten im Sediment auszuwaschen, die nicht durch das Ficoll gewandert sind, wurde eine Erythrozyten-Lyse mit sterilem Wasser durchgeführt. Dafür wurden die Proben kurzzeitig mit sterilem Wasser versetzt, bevor die Reaktion durch die Zugabe von PBS abgestoppt und die Zellproben abschließend für 6 min pelletiert wurden. Das resultierende Zell-Pellet wurde zur anschließenden Bestimmung der Zellzahl in 10 ml PBS aufgenommen.



Schichtung vor Zentrifugation

Schichtung nach Zentrifugation

Abbildung 4: Schichtung einer Blutprobe vor und nach einer Dichtegradientenzentrifugation

Vor der Zentrifugation befindet sich die Vollblutprobe oberhalb der Ficoll-Schicht. Nach der Zentrifugation liegt eine Mehrschichtung nach der jeweiligen Dichte der Zellen vor. Die Schicht mit der höchsten Dichte befindet sich am Boden des Falcons und besteht aus Erythrozyten, dicht gefolgt von Granulozyten. Darüber liegt die Ficoll-Schicht, die mit ihrer speziellen Dichte die verschiedenen Blutbestandteile trennt. Als feine Schicht folgen die PBMCs darüber. Das Plasma hat mit den Thrombozyten die geringste Dichte und liegt als oberste und breiteste Schicht auf.

(Eigene Darstellung)

4.3 Bestimmung der Zellzahl

Bevor die Proben für die Zwischenlagerung eingefroren wurden, wurde die Zellzahl aller 4 Proben bestimmt. Es wurden 10 µl des PBS-Zell-Gemisches im Verhältnis 1:1 mit Trypan-Blau vermischt. Davon wiederum wurden 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypan-Blau wird für die Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen benötigt, da nur tote Zellen diesen Farbstoff aufnehmen [87]. Bei vitalen Zellen kann der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren und somit diese Zellen auch nicht dunkelblau anfärben [87]. In den vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer wurden jeweils die Anzahl der vitalen Zellen ermittelt und anhand des Mittelwertes dieser Zählung und unter Einbezug des Verdünnungsfaktors die Anzahl der Zellen pro Milliliter extrapoliert. Da insgesamt 10 ml des Gemisches vorlagen, wurde die Anzahl der Zellen pro ml mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Gesamtzellzahl zu ermitteln. Für Spenderin 1 konnten $2,95 \times 10^7$, für Spenderin 2 $3,125 \times 10^7$, für Spenderin 3 $0,99 \times 10^7$ und für Spenderin 4 $1,65 \times 10^7$ Zellen isoliert werden.

4.4 Kryokonservierung der Proben

Die isolierten PBMC-Proben wurden nicht direkt im Anschluss weiterbearbeitet, sondern zunächst als Kryokulturen zwischengelagert. Es wurden Aliquots von jeweils 5×10^6 Zellen erstellt. Bei Spenderin 1 und Spenderin 2 konnten somit jeweils 5 Ansätze gewonnen werden. Aus den Zellen von Spenderin 3 konnten 2 und bei Spenderin 4 konnten jeweils 3 Ansätze gewonnen werden.

Die PBS-PBMC-Gemische wurden vor der Kryokonservierung nochmals für 6 min bei 1.600 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde danach verworfen. Das Zellpellet wurde in einem 1:1 Mix aus den nachfolgend beschriebenen Kryomedien A und B resuspendiert. Kryomedium A bestand zu 50 % aus dem Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-Medium und zu 50 % aus fetalem Kälberserum (FCS). Das Kryomedium B bestand zu 20 % aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und zu 80 % aus FCS. DMSO besitzt eine geringe Molekularmasse und kann dadurch als intrazelluläres Schutzmittel wirken [8]. Das physiologisch vorkommende Wasser innerhalb der Zellmembran wird während des Einfrierens in Eiskristalle umgewandelt und es kommt zu einer Dehydrierung der Zelle [8]. Durch dadurch entstandene Lücken in der Zellmembran können Zellinhalte entweichen und es findet ein Zelluntergang statt [8]. Diesen Vorgang kann DMSO als Schutzmittel unterbinden, indem es durch die Bindung von Wasser in der Zellmembran die Ausbildung von Eiskristallen verhindert [8]. DMSO ist das am häufigsten genutzte Kryo-Schutzmittel und wird vorrangig bei langsam verlaufenden Kryokonservierung

wie im vorliegenden Fall genutzt [8]. FCS wird als Nährmittel dazu gegeben, um den Zellerhalt zu fördern [8]. Besonders für die Zellerholung während des Auftauens im darauffolgenden Schritt spielt das FCS eine wichtige Rolle [8]. Das RPMI-Medium ist das Basismedium für die Kultivierung von PBMCs und enthält eine Reihe von Nährstoffen und Vitamine [88]. Des Weiteren enthalten RPMI-Medien ein Bicarbonat-Puffer System, welches den pH-Wert der Zelle aufrechterhalten kann [88].

Die PBS-PBMC-Gemische wurden vor der Kryokonservierung nochmals für 6 min zentrifugiert und der Überstand wurde danach verworfen. Das Zellpellet wurde in Kryomedium A resuspendiert, wobei pro Ansatz jeweils 500 µl Kryomedium A benötigt wurden. Das Gemisch aus Kryomedium A und Zellen wurden auf die entsprechende Anzahl der Ansätze mit jeweils 500 µl aufgeteilt und darin mit jeweils 600 µl des Kryomediums B vermischt.

Die Schnelligkeit, in welcher die Ansätze herunter gekühlt werden, haben einen großen Einfluss auf das Zellüberleben [8]. Wenn ein so genanntes Supercooling stattfindet, haben Schutzmittel kaum Zeit, die Zellen zu erreichen und es entstehen vermehrt Eiskristalle, welche zu einer hohen Anzahl an toten Zellen führen [8]. Bei einem zu langsamen Gefrierprozess können Schutzmittel zu lange einwirken und durch den dadurch ausgelösten osmotischen Prozess schrumpft die Zelle und wird instabil [8]. Daraus zu schließen ist, dass das Tempo, indem die Zellen einfrieren, exakt getaktet werden muss. Im vorliegenden Versuch wurde dies mit Hilfe eines Gefrierbehälters erreicht, der zum Teil mit dem Alkohol Isopropanol gefüllt ist und kontrolliert die Proben um $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ herunterkühlt [8]. Die Kryogefäße mit den Ansätzen wurden in den Gefrierbehälter gestellt und über Nacht bei -80°C gelagert. Im Anschluss wurden die Ansätze der Spenderin 1 und 2 für 77 Tage und die Ansätze der Spenderin 3 und 4 für 70 Tage in flüssigen Stickstoff gelagert.

4.5 Immunzell-Aktivierung

Zur Induktion der Immunzell-Aktivierung wurden die kryokonservierten Zellproben für einige Minuten in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Durchschnittlich erwärmt sich in einem 37°C warmen Wasserbad eine Probe um $\sim 65^{\circ}\text{C}/\text{min}$ [8]. Die angestrebte Zieltemperatur sollte 4°C nicht überschreiten, da sonst ein erhöhtes Absterben der Zellen stattfindet. Zum Entfernen des Kryomediums wurden die Proben im Anschluss für 6 min bei 1.600 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Alle Pellets wurden jeweils in 500 µl frischem Zellkultur-Medium (RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und bei einem Gesamtvolumen von jeweils 4 ml in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät. Zur Erholung vom

Auftauprozess wurden die Zellproben über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Zellen wurden zunächst resuspendiert und dann erneut ausgezählt. Pro Zeitverlaufsprobe wurden jeweils $6-7 \times 10^5$ vitale Zellen entnommen, pelletiert (6 min, 1.600 rpm) und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und bei einem Gesamtvolumen von 500 µl in eine 24-*well*-Platte ausgesät. Es folgte nun die *in vitro* Aktivierung der erhaltenen Immunzellen, um die Produktion von Zelltyp spezifischen molekularen Markern zu stimulieren. Dazu wurde die Immunzellaktivierung durch die Zugabe von PMA/Ionomycin induziert. Ionomycin ist ein Calcium Ionophor, welches durch das Bakterium *Streptomyces globatus* produziert wird [89]. Durch die Stimulation mittels Ionomycin wird der Einstrom von Calcium-Ionen (Ca²⁺) über die Zellmembran in das Zytosol induziert [89]. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ist maßgeblich wichtig für den Prozess der Aktivierung einer Immunzelle [89]. PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) ist eine Phorbol-Verbindung, die aus der Pflanze *Croton tiglium* gewonnen werden kann und auf die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) wirkt, welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der Immunzellaktivierung spielt [19]. Der immunaktivierende Effekt des PMA/Ionomycin Gemisches beruht somit auf der Induktion von Ca²⁺-abhängigen Signalketten und einer synergistischen Stimulation der PKC-Aktivität [16].

Im vorliegenden Versuch wurde dem Medium für die Aktivierung der Zellen PMA und Ionomycin in einer Endkonzentration von 5 ng/ml und 500 ng/ml zugegeben. Die Proben wurden anschließend im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

Für jeden der vier Spenderinnen wurde eine Zellprobe vor Zugabe des PMA/Ionomycin-Gemisches entnommen (0 h) sowie Proben nach 2-, 4- und 8-stündiger Aktivierung gesammelt. Dabei wurden die Zellen jeweils aus separaten *wells* entnommen. Somit ergaben sich für die vier Spenderinnen insgesamt 16 Zeitverlaufsproben.

Direkt im Anschluss an die Entnahme wurden die Zellproben fixiert, um die enthaltene RNA für die spätere Analyse mittels Einzelzell-Sequenzierung zu konservieren (siehe Unterpunkt 4.7). Zugleich wurde ein Teil der Zellen separiert, mithilfe einer Paraformaldehyd-Lösung fixiert und nach der Färbung von ausgewählten Zellmarkern mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe Unterpunkt 4.9).

4.6 Methanol-Fixierung der PBMCs

Die Methanol-Fixierung und die spätere Rehydrierung der Zellproben für die Analyse mittels Einzelzell-Sequenzierung wurden in Anlehnung an ein zuvor von Chen et al. [17] beschriebenes Protokoll durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge mit 1600 rpm pelletiert. Unter Verwendung einer wide-bore Pipettenspitze wurden die Zellproben zur Entfernung von verbleibendem Medium zweimal mit einer Lösung aus 0,04 % bovine serum albumin (BSA) in PBS (Calcium und Magnesium frei) gewaschen und anschließend in 200 µl dieser Lösung resuspendiert. Bei BSA handelt es sich um Albumin aus Rinderserum, welches eine Vielzahl an Funktionen besitzt [90]. Hier führte BSA unter anderem dazu, dass die Zellen vermindert an den Plastikwänden der Reaktionsgefäße klebten. Weitere Eigenschaften sind unter anderem eine antioxidative Wirkung, die Stress gegenüber den Zellen und daraus folgende Zellschäden vermindert [90].

An dieser Stelle wurde jeder Zeitverlaufsprobe ein Aliquot von 50 µl entnommen. Diese Zellen wurden gesondert für weiterführende FACS-Analysen weiterbearbeitet (siehe Unterpunkt 4.9).

Für die Fixierung der bleibenden Zellen wurde 800 µl Methanol, welches auf – 20 °C vorgekühlt worden war, unter Rühren zugetropft und die Proben für 30 min bei - 20 °C fixiert. Danach konnten die Proben für bis zu 3 Monaten bei -80°C gelagert werden. Methanol verursacht eine Dehydratation der Zellen und dadurch eine Denaturierung von Strukturproteinen [78]. Des Weiteren werden dadurch Biomoleküle wie Proteasen und RNasen angegriffen und zerstört, welche normalerweise RNA schädigen und zu deren Degradierung führen [78]. Dadurch wird der Abbau der in den Zellen vorliegenden RNA verhindert. Nukleinsäuren werden durch Alkohol nicht beeinflusst und können so konserviert werden [78].

4.7 Analyse der PBMC-Zeitverlaufsproben mittels Einzelzell-Sequenzierung (single-cell sequencing)

Die Betrachtung der Einzelzelle auf Genomebene ist das Ziel der Einzelzell-Sequenzierung (auf engl. Single-cell sequencing), ein Verfahren, welches in den letzten Jahren Standard der Genomaufschlüsselung einer Zellpopulation geworden ist [83]. Im Falle des vorliegenden Versuchs wurde eine Einzelzell-Transkriptom-Analyse (Single cell transcriptome sequencing; scRNA-seq) durchgeführt, bei welcher die Gesamtheit der zellulär exprimierten RNAs

innerhalb einer Zelle, das sogenannte Transkriptom, aufgeschlüsselt wurde [83]. Im Vorliegenden Fall wurden ein System auf Grundlage von sogenannten Droplet-based microfluidics verwendet, um die Zellen zu vereinzeln. Hierbei werden die PBMCs einzeln in Droplets aufgenommen, in denen neben den isolierten Zellen Lyse Puffer und barkodierte beads vorliegen [83]. Die Vereinzelung der Zellen geschieht im vorliegenden Fall durch eine Gel bead in Emulsion (GEM) [83]. Dabei entsteht durch den Zustrom eines lipophilen Carrier Öls zu den in einer hydrophilen Phase vorliegenden Zellen eine Emulsion [83]. In dieser werden die hydrophilen Zellen einzeln von einer Ölschicht umschlossen, wobei die dadurch entstehenden droplets von uniformer Größe und Form sind [83]. In den droplets werden die Zellen lysiert, damit die darin erhaltene RNA und DNA freigesetzt wird [83]. Die barkodierten beads erkennen den Poly(A)-Schwanz der mRNA und hybridisieren diese, um die nächsten Schritte ein zu leiten [83]. Die zelluläre mRNA wird zunächst durch eine reverse Transkription in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben [83]. Im Anschluss wird das gewonnene Genmaterial amplifiziert, also vervielfältigt, damit dieses für die nachfolgende Sequenzierung ausreicht, bei welcher die Nukleotid Reihenfolge ermittelt wird [83]. Durch diese Technik können tausende an Zellen simultan analysiert werden [83].

Die Laborarbeiten zur Erstellung der Sequenzierungsbanken wurden freundlicherweise durch Frau Dr. Caroline Diener (Institut für Humangenetik, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Eckart Meese, Universität des Saarlandes) vorgenommen. Die Vorgehensweise ist im Folgenden kurz zusammengefasst.

Die fixierten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, pelletiert (6 min, 1.600 rpm, 4 °C) und anschließend in kalter SSC-Lösung rehydriert (3x *saline sodium citrate* (SSC) Puffer (Sigma Aldrich), 0,04 % BSA (UltraPure, Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,2 U/µl RNase Inhibitor (Protector, Sigma Aldrich) und 1 mM DL-Dithiothreitol (DDT) Lösung (BioUltra, Sigma Aldrich)) in Nuklease-freiem Wasser). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 6000 Zellen pro Probe zur Analyse des Transkriptoms eingesetzt.

Die Einzelzell-Transkriptom-Banken wurden entsprechend des „10x Genomics Single Cell“ Herstellerprotokolls der Firma 10x Genomics, Inc. (Pleasanton, CA, Vereinigte Staaten) erstellt. Für die Aufsplittung der Zellen auf einzelne *droplets/GEMs* und zur Selektion der *Barcodes*, die später der Zuordnung der enthaltenen Einzelzellen dienen, wurden ein „Chromium Controller“ (GCG-SR-1; 10x Genomics, Inc.) und das „Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit“ (PN-1000120; 10x Genomics, Inc.) verwendet. Die zelluläre RNA wurde mithilfe des „Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits“ (v3.1; PN-1000268; 10x Genomics, Inc.) zunächst zu cDNA umgeschrieben, die anschließend amplifiziert und mit Adaptoren und Indices ligiert wurde. Zur Unterscheidung wurde für jede Probe ein spezifischer Sequenz-Index dem „Dual Index Kit TT Set A“ (PN-1000215; 10x Genomics, Inc.) entnommen. Zur thermischen Behandlung wurde ein Thermocycler der Firma Thermo Fisher Scientific

genutzt (Applied Biosystems MiniAmp Thermocycler). Für die Zwischenanalyse der Probenqualität wurde das „Agilent High Sensitivity DNA Kit“ auf einem „Agilent 2100 Bioanalyzer instrument“ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Vereinigte Staaten) verwendet. Die Quantifizierung der Transkriptom-Banken wurde mithilfe des „Invitrogen Colibri Library Quantification Kit“ und einem „QuantStudio 3 Real-Time-PCR“ Gerät (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Die Einzelzell-Transkriptom-Banken (*libraries*) der 16 Zeitverlaufsproben wurden zu gleichen Mengen gepoolt.

Die finale Sequenzierung (Novaseq S4 PE150) der resultierenden Gesamt-*library* wurde als externe Dienstleistung durch das Novogene (UK)-Sequenzierungszentrum (Cambridge, Vereinigtes Königreich) vorgenommen.

4.8 Bioinformatische Prozessierung zur Auswertung der Einzelzell-Sequenzierungsdaten

Die Prozessierung der Sequenzierungsdaten und die bioinformatischen Analysen der Ergebnisse wurden, in Kooperation mit dem Lehrstuhl für klinische Bioinformatik (Arbeitsgruppe: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Keller, Universität des Saarlandes, Standort Saarbrücken), freundlicherweise durch Frau Friederike Grandke durchgeführt.

Um eine ausreichende Qualität der Einzelzell-Sequenzierungsdaten gewährleisten zu können, wurde eine Quality Control der Ergebnisse mit Hilfe der Software „*Cell Ranger*“ der Firma 10x Genomics durchgeführt. Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurde die Qualität der Zellen, der Sequenzierung und des Mappings, also der Zuordnung der mRNA zu einem bestimmten Gen, überprüft.

Für das Mapping der Gene wurden die ausgelesenen Gene mit dem hg38 Genom (refdata-gex-GRCh38-2020-A) mittels „*Cell Ranger*“ Software (v.7.0.0) (10x Genomics) verglichen. Für die weiteren Analyseschritte wurden nur Zellen mit einer Mindestanzahl von 200 UMIs ausgewählt. Weitere Qualitätskriterien waren eine Mindestanzahl an 200 und eine Höchstanzahl von 3.500 Genen pro Zelle. Zellen, welche außerhalb dieses Rasters lagen, wurden ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Zellen mit einem prozentualen Anteil an mitochondrialen Genen von mehr als 5 %. Mittels „*SoupX*“ wurde RNA aus der Umgebung, welche eine Kontamination der Proben darstellt, entfernt. *Droplets*, welche zwei Zellen enthalten, sogenannte *douplet* (engl.), wurden mittels *doubletFinder* identifiziert.

Dies resultierte in einem Datensatz von 57.375 Zellen, welcher mittels *Seurat's integrateData Function* und einer k.weight von 100 integriert und mittels *Seurat's NormalizeData* und *ScaleData Function* normalisiert worden ist. Durch eine PCA (engl. Principal Component Analysis) wurden die mehrdimensionalen Datensätze auf die 30 Variablen reduziert, welche

die meiste Varianz erfassen. Die daraus gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von UMAP zweidimensional dargestellt. Durch *Seurat's FindNeighbors* und *FindClusters functions* wurde mit einer Auflösung von 0,8 eine Clusterung der Zellen durchgeführt. Basierend auf dieser Cluster-Einteilung und bekannten Zellmarkern wurde eine Annotation der Gene durchgeführt, wobei Cluster, welche mit dem gleichen Zelltyp in Verbindung gebracht worden sind, zu einem Cluster zusammengeführt wurden. Insgesamt wurden die Zellen als CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen oder Monozyten klassifiziert. Cluster, welche nicht diesen Zelltypen zugeordnet werden konnten, wurden als unbekannt oder gemischt bezeichnet. Die Ergebnisse der Auswertungen wurden freundlicherweise als graphische Übersicht zur Verfügung gestellt und für die Darstellung im Ergebnisteil modifiziert.

4.9 Zelluläre Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand unterschiedlicher Eigenschaften wie Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften unterschieden werden [51]. Genauere Aussagen über den Phänotyp und die Eigenschaften einer Zellpopulation können getroffen werden, indem fluoreszenz-gekoppelte Antikörper an diese Zielstrukturen binden [51]. Die markierten Zellen laufen einzeln an einen Laser vorbei, der die gefärbten Antikörper auf den Zellen erfasst [51]. Dadurch werden die Antikörper angeregt und senden Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, welches spezifisch auf einen Fluoreszenzfarbstoff zurück zu führen ist [51]. Ein großer Vorteil der Durchflusszytometrie ist die hohe Anzahl an Zellen, die in kürzester Zeit phänotypisch charakterisiert werden kann [51].

Dieses Verfahren wurde genutzt, um die prozentualen Anteile der CD4+ und CD8+ T-Zellen, als größte Subpopulation der PBMCs, zu ermitteln. Da alle Arten von Immunzellen unterschiedliche Oberflächenantigene produzieren, können diese durch gezielte Antikörper markiert und gezählt werden. Des Weiteren konnte über die Analyse des CD69-Oberflächenproteins der Aktivierungszustand der T-Lymphozyten nachgewiesen werden. CD69 gilt als Marker für den frühen Verlauf der T-Zell-Aktivierung [84].

Wie im Unterpunkt 4.6 vermerkt, wurden im Anschluss an das Sammeln der Zeitverlaufsproben zelluläre Aliquots entnommen. Diese wurden pelletiert und als Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Untersuchung mit einer 4-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert. Dadurch werden die Proteine nicht denaturiert, es findet stattdessen ein Cross-linking zwischen den Proteinen statt und die Zellen werden als Ganzes erhalten [74]. Das Zell-PFA-Gemisch wurde für 15 min bei 4 °C inkubiert, bevor diese

zweimal mit einer 1 ml PBS-FCS-Lösung gewaschen worden sind. Wie auch bei der Methanol-Fixierung verhindert FCS eine Anheftung der Zellen an die Plastikwände der Gefäße und wirkt zugleich als Schutzkolloid. Im Anschluss wurden die Pellets in 100 µl PBS-FCS-Lösung aufgenommen und bei 4 °C dunkel gelagert. Die Zellproben wurde am folgenden Tag mithilfe von fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt (anti-CD69 (Mouse Anti-Human CD69-PE; Clone TP1.55.3; Beckman Coulter; Brea, United States), anti-CD8 (Mouse Anti-Human CD8 (AB_2738101; Becton, Dickinson (BD) and Company) und anti-CD4 (Mouse Anti-Human CD4 (AB_398593; Becton, Dickinson (BD) and Company). Anschließend wurden die markierten Proben mit einem „FACS Canto II“ Durchflusszytometer (Becton, Dickinson (BD) and Company; Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten) untersucht und die Daten mittels „BD FACSDiva™“ Software (v.6.1.3) ausgewertet. Es wurden zwischen 10^3 und 10^4 Zellen pro Ansatz analysiert.

Die Antikörper-Färbungen wurden freundlicherweise durch Frau Dr. Caroline Diener (Institut für Humangenetik, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Eckart Meese, Universität des Saarlandes) und Frau Tanja Tänzer (Arbeitsgruppe: PD Dr. Barbara Walch-Rückheim) vorgenommen. Die durchflusszytometrische Untersuchung und die Auswertung der resultierenden Daten wurde, in Kooperation mit der Nachwuchsgruppe Virologie (Zentrum für Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes), freundlicherweise durch Frau PD Dr. Barbara Walch-Rückheim durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Überblick zur methodischen Vorgehensweise

In der nachfolgenden Abbildung 5 wird ein Überblick über die methodische Vorgehensweise der Isolierung und Aktivierung der PBMCs und deren anschließenden Analyse mittels Einzelzell-Sequenzierung dargestellt. Es wurden peripher venöse Blutproben von vier gesunden Probandinnen (alle weiblich, 21 Jahre alt) entnommen. Direkt im Anschluss wurden die PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden mit Kryomedium versetzt und für einen Zeitraum von 70, bzw. 77 Tage in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Nach Auftauen der Zellproben wurde mittels Trypan-Blau-Färbung und anschließender Auszählung der Anteil der vitalen Zellen bestimmt. Zur Induktion der Immunzell-Aktivierung wurden pro Reaktion jeweils $6-7 \times 10^5$ vitale Zellen in Zellkulturplatten ausgesät und *in vitro* mit einem Gemisch aus PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Ionomycin stimuliert. PMA/Ionomycin wird standardmäßig für die Stimulation von T-Lymphozyten genutzt und führt nachweislich zu einer verstärkten Zytokin Produktion [2]. Neben den T-Zellen, welche den größten Anteil der PBMCs bilden [38], konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass die PMA/Ionomycin-Stimulation auch die immunologischen Signalwege in den übrig vorliegenden PBMCs induziert (B-Zellen [67], Monozyten [53], Natürliche Killerzellen [37] und dendritische Zellen [20]). Für jeden der vier Spenderinnen wurde eine Probe vor Zugabe des PMA/Ionomycin-Gemisches (0 h) sowie nach 2-, 4- und 8-stündiger Inkubation gesammelt. Somit ergaben sich für die vier Spenderinnen insgesamt 16 PBMC-Zellproben. Zur Konservierung bis zur späteren Untersuchung mittels Einzelzell-Sequenzierung wurden die PBMC-Proben durch ein Methanol-basierendes Verfahren anhand eines von Chen et al. [17] beschriebenen Protokolls fixiert. Methanol verursacht eine Dehydratation der Zellen, welche zu einer Denaturierung von Strukturproteinen führt und Biomoleküle wie Proteasen und RNasen zerstört, wodurch die Schädigung und Abbau der Zell-RNA verhindert wird [78]. Daneben wurde ein Teil der Zellen entnommen und mit einer 4-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung fixiert, um diese im Folgenden mittels Durchflusszytometrie zu analysieren.

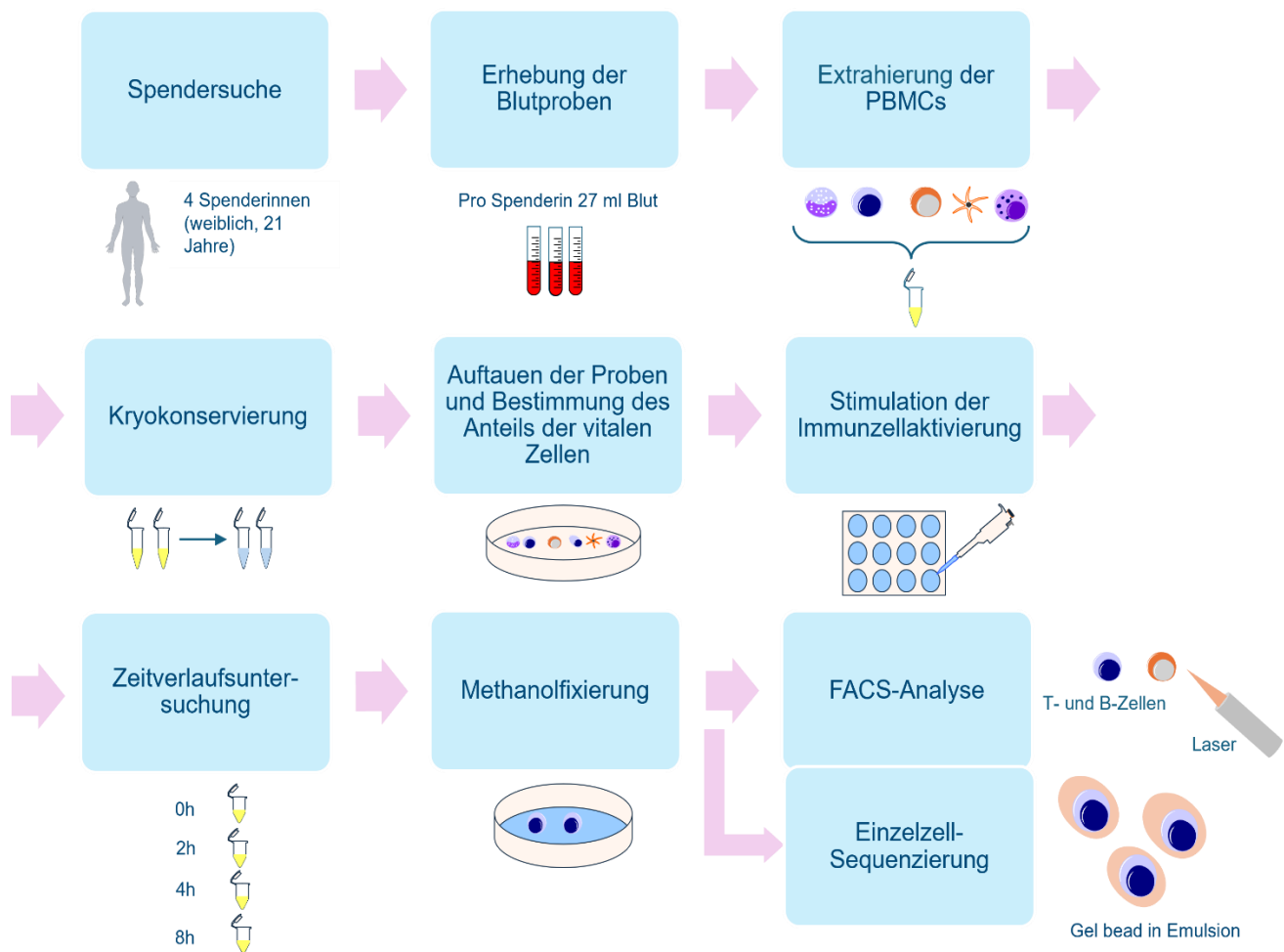


Abbildung 5: Methodischer Überblick über die Isolierung und Aktivierung von PBMCs und zur anschließenden Analyse mittels Einzelzell-Sequenzierung

Nachdem 4 junge, gesunde Spenderinnen rekrutiert worden sind, wurde von diesen im ersten Schritt jeweils 27 ml peripher venöses Blut entnommen und die darin enthaltenen PBMCs extrahiert. Die gewonnenen Zellen wurden zur Zwischenlagerung kryokonserviert und im Anschluss nach dem Auftauen der Proben ausgezählt, wobei der Anteil der vitalen Zellen als Qualitätskontrolle ermittelt wurde. Im nächsten Schritt wurden die PBMCs *in vitro* aktiviert und es wurden Zeitverlaufsproben vor Aktivierung (0 h) sowie 2, 4 und 8 h nach Aktivierung gesammelt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen mithilfe von Methanol fixiert und nach weiterer Zwischenlagerung im Rahmen der Einzelzell-Sequenzierung analysiert. An einem Teil der PBMCs wurde eine Qualitätskontrolle anhand einer FACS-Analyse durchgeführt.

(Eigene Darstellung)

5.2 Qualitative Kontrolle wichtiger Protokollschritte

5.2.1 Bestimmung des Anteils der vitalen Zellen nach der Kryokonservierung

Die kryokonservierten Proben wurden von Spenderin 1 und Spenderin 2 nach 77 Tagen und von Spenderin 3 und Spenderin 4 nach 70 Tagen wieder aufgetaut. An dieser Stelle wurde das erste Mal eine Qualitätskontrolle durchgeführt, indem Aliquots der Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt wurden. Dabei wurden die Zellen mit dem Azofarbstoff Trypan-Blau behandelt. Bei vitalen Zellen kann der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren, so dass eine Unterscheidung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen möglich ist [87]. Es wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen gegenüber den toten Zellen ermittelt.

Für die Qualitätssicherung der nachfolgenden Analysen ist es von Bedeutung, dass möglichst viele Zellen die Kryokonservierung überleben. Nur so ist eine erfolgreiche Weiterverarbeitung der Zellen möglich. In der folgenden Abbildung 6 sind die prozentualen Anteile der vitalen Zellen pro Spenderin dargestellt. Dazu wurden die Ergebnisse der Zellzählungen als Gesamtergebnis für alle Zeitpunkte ausgewertet und sind als Mittelwerte für jede der Spenderinnen dargestellt.

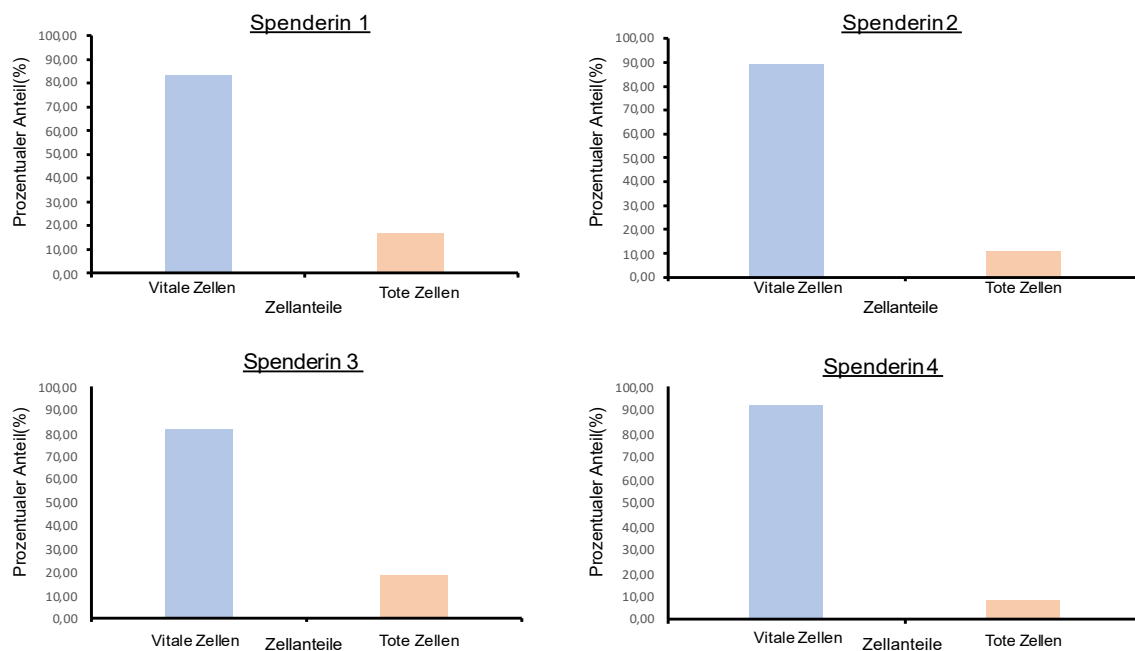


Abbildung 134: Anzahl der vitalen Zellen nach Kryokonservierung aller Spenderinnen

Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil der vitalen und toten Zellen aller Spenderinnen nach der Kryokonservierung. Dafür wurden die mit Trypanblau angefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen betrug bei Spenderin 1 83,33 %, bei Spenderin 2 89,05 %, bei Spenderin 3 81,58 % und bei Spenderin 4 91,98 % aller gezählten Zellen. Bei allen Spenderinnen handelte es sich somit bei mindestens 80 % der aufgetauten Zellen um vitale Zellen.

5.2.2 Überprüfung der Effizienz des Aktivierungsstimulus

Die zweite Qualitätskontrolle wurde auf Grundlage der in Paraformaldehyd-Lösung fixierten Zellen durchgeführt. Dabei wurden exemplarisch die T-Zellen als größte Subgruppe der PBMCs analysiert. Zum einen wurde nach der Kryokonservierung der Anteil der CD4+ und CD8+ T-Zellen an allen PBMCs bestimmt (Abbildung 7). Zum anderen wurde eine Kontrolle der Immunaktivierung durchgeführt, indem die Expression des Oberflächenmarkers CD69+ im Zeitverlauf überprüft wurde (Abbildung 8), der als früher Marker der T-Zell-Aktivierung gilt [84].

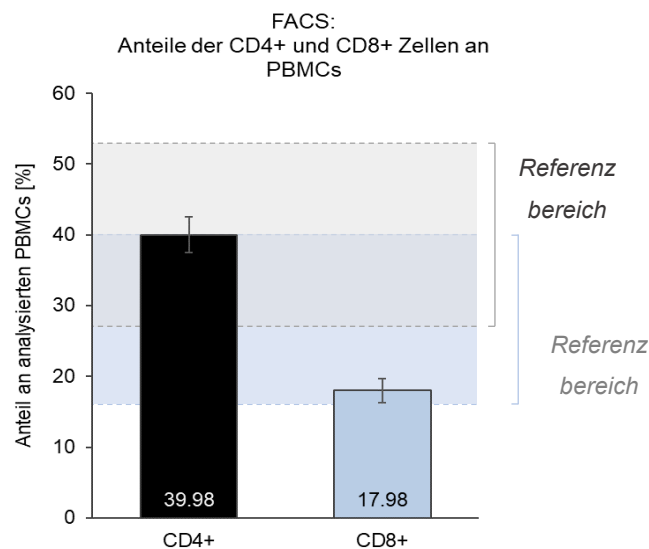


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Anteile an CD4+ und CD8+ Zellen der PBMCs

Die durchschnittlichen Anteile der CD4+ und CD8+ Zellen an den PBMCs sind als Gesamtergebnis für die Zeitverlaufsanalysen der vier Probandinnen mit Angabe des zugehörigen Standardfehlers (Fehlerindikatoren) dargestellt. Der Referenzbereich der CD4+ T-Zellen liegt bei gesunden Erwachsenen zwischen 27 und 53 % und der Anteil an CD8+ T-Zellen in einem Bereich zwischen 16 und 40 % (nach [26]).

Wie in Abbildung 7 dargestellt, lag die Anzahl an T-Zellen in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellproben im zu erwartenden Referenzbereich eines gesunden Erwachsenen. Der Anteil an CD4+ T-Zellen lag mit 39,98 % (Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM): $\pm 2,54$) innerhalb des entsprechenden Referenzbereiches von 27-53 % [51]. Mit 17,98 % (SEM: $\pm 1,73$) lag die Anzahl der CD8+ Zellen im unteren Anteil des Referenzbereiches von 16-40 % [51].

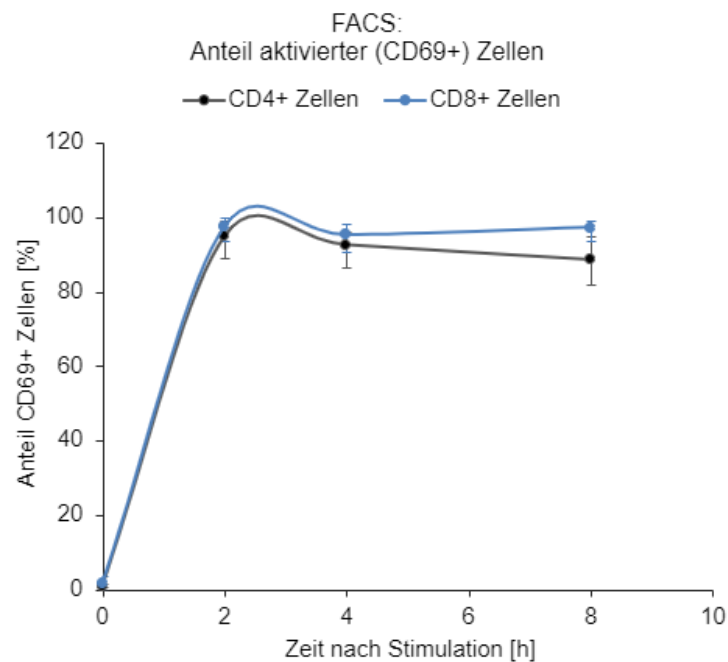


Abbildung 560: Graphische Darstellung der Anteile der CD69+ Zellen im Verlauf über 8 Stunden

Mittels FACS-Analyse wurde die Expression von CD69 auf der Oberfläche der CD4+ und CD8+ T-Zellen analysiert. Der prozentuale Anteil der CD69+ Zellen an den CD4+ (schwarz) und CD8+ Zellen (blau) ist über einen Zeitverlauf von 8 Stunden nach Stimulation graphisch dargestellt. Dabei ist für den jeweiligen Zeitpunkt das Durchschnittsergebnis aus der Untersuchung der vier Spenderinnen mit Angabe der zugehörigen Gesamtvarianz (Fehlerindikatoren) abgebildet.

Der Anteil der CD69+ T-Zellen stieg nach der Stimulation durch PMA/Ionomycin in den ersten Stunden annähernd linear an und erreichte nach 2 Stunden die höchste Anzahl an positiven Zellen, bei dem so gut wie alle der untersuchten Zellen CD69 exprimierten. Als Gesamtergebnis für die Zellproben aller vier Spender lag der durchschnittliche Anteil der CD69+ an den analysierten CD4+ Zellen zu Beginn des Zeitverlaufs (0 h) bei 1,1 % (Varianz: +0,4/-0,3%) und stieg nach zweistündiger Stimulation auf einen Wert von 94 % (Varianz: +4,3 %/-5,7 %). Im Falle der CD8+ Zellen stieg der Anteil der CD69+ Zellen im selben Zeitraum von 1,7 % (Varianz: +1,9/-1,7%) auf einen Wert von 97,5 % (Varianz: +2,5 %/-3,9 %). Nach 4 Stunden lag der durchschnittliche Anteil der CD69+ Zellen sowohl unter den CD4+ als auch unter den CD8+ Zellen weiterhin stabil in einem hohen Bereich von mehr als 90 %. Im weiteren Verlauf bleibt der prozentuale Anteil der CD69+ Zellen bei den CD8+ T-Zellen mit 97,3 % (Varianz: +1,9 %/-3,5 %) relativ stabil, während die Expression bei den CD4+ T-Zellen mit 88,6 % (Varianz: +6,2 %/-6,6 %) eine leicht abnehmende Tendenz aufwies.

5.2.3 Überprüfung der qualitativen Parameter der finalen Einzelzell-Sequenzierung

Die dritte Qualitätskontrolle wurde im Rahmen der Einzelzell-Sequenzierung durchgeführt. In Tabelle 5 sind die wichtigsten qualitativen Parameter unter Angaben der Richtwerte der Analysesoftware (*Cell Ranger*) und die analysierten Werte der Spenderproben aufgeführt.

Wie im Methodenteil dargestellt, wurden durch die Analyse-Software die Qualität der Zellen, des Sequenzierungsvorganges und des darauffolgenden Mappings der Gene überprüft. Die nachfolgend genannten Referenzwerte beziehen sich, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf die Vorgaben der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Qualitätsanalyse-Software (*Cell Ranger* der Firma 10x Genomics, Inc.).

Für die qualitative Bewertung des Ausgangsprobenmaterials und der resultierenden Sequenzierungsdaten kann unter anderem die Expression von mitochondrialen Genen betrachtet werden [34] [72]. Eine hohe Expression von mitochondrialen Genen kann als Zeichen für erhöhten zellulären Stress gedeutet werden [23]. Um die Integrität der zellulären Ausgangsproben und damit eine ausreichend hohe Qualität der resultierenden Sequenzierungsdaten zu gewährleisten, sollte der Anteil der mitochondrialen Genen an allen Genen in der Regel unter 10 % liegen [23]. Im Rahmen der vorliegenden Analysen wurde auf Grundlage dessen ein prozentualer Anteil von unter 5 % als strikte Voraussetzung für den Einbezug der Einzelzelldaten in die Gesamtauswertung gewählt. Neben der Überprüfung der mitochondrialen Gene gehören die Anzahl der detektierten Gene und der sogenannten UMIs zu den wichtigsten Parametern der Qualitätskontrolle [72]. Eine außergewöhnlich hohe Anzahl an Genen pro Zelle wird im Rahmen von Einzelzell-Sequenzierungsanalysen als Hinweis auf ein *douplet*, also ein *Droplet* mit zwei enthaltenden Zellen, gesehen, was wiederum bei erhöhten Vorkommen für eine reduzierte Probenqualität spricht [72]. Daher wurde ein Rahmen zwischen 200 und 3.500 detektierten Genen (pro Zell-assoziiertem *Barcode*) als Voraussetzung für den Einbezug der Einzelzelldaten in die Gesamtauswertung gewählt. Durch die Anwendung von UMIs (engl.: *unique molecular identifiers*) werden mRNAs zusätzlich markiert. Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen *Reads* amplifizierter Kopien einer mRNA, welche die gleichen UMIs besitzen, von unterschiedlichen transkribierten mRNAs eines Gens, welche jeweils mit einem eigenen spezifischen UMI markiert werden [50]. Einzelzell-Sequenzierungsdaten, welche weniger als 200 bis 300 UMIs pro Zelle aufweisen, werden in der Regel als qualitativ mangelhaft betrachtet [34] und gelten als Hinweis auf vorangegangene Zellschäden [72]. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Analysen ein Minimum von 200 UMIs als weiteres Filterkriterium für den Einbezug der Einzelzelldaten gewählt.

In der Abbildung 9 ist exemplarisch für Spender 1 und den 0 h Zeitpunkt die repräsentative Verteilung der sequenzierten Einzelzellen mit Angabe der Anzahl an Genen und UMIs pro

Zelle sowie dem prozentualen Anteil an mitochondrialen Genen dargestellt. Dabei wird deutlich, dass nur ein geringer Anteil der Zellen auf Grundlage der oben genannten Filterkriterien von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden musste. Dies deutet auf eine gute Qualität des zellulären Probenmaterials hin und spricht für einen sehr geringen Anteil an Zellen, welche mit zellulärem Stress auf die Behandlung vor der Sequenzierungsanalyse reagierten. Eine ähnliche Verteilung lag auch bei den übrigen Zeitverlaufsproben vor. Insgesamt konnten, nach dem Filtern der Daten, 57.375 Einzelzellen in die Gesamtauswertung einbezogen werden. Wie in Tabelle 5 zusammengefasst lag die mediane Anzahl an Genen pro Zelle in den resultierenden Datensätzen in einem Bereich zwischen 2.011 und 2.949. Die mediane Anzahl an UMIs lag in einem Bereich zwischen 5.405 und 7.740. Die zu erwartende Anzahl an UMIs pro Zelle sollte anhand von vergleichbaren Studien in einem breiten Rahmen zwischen 800 und 15.000 liegen [25][34].

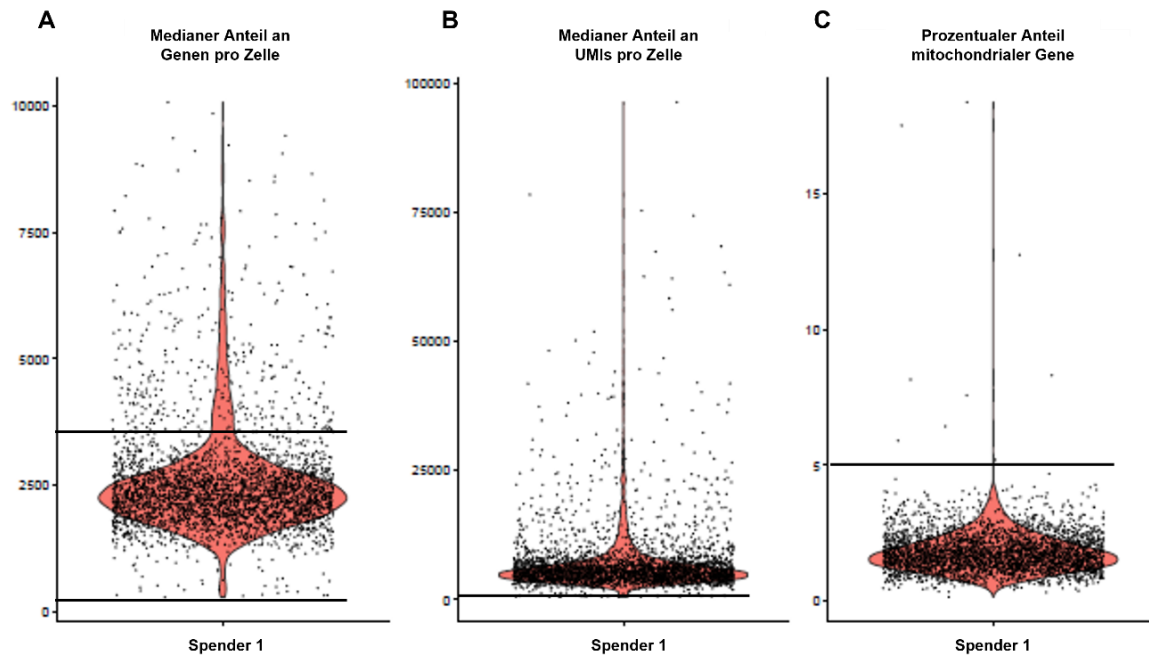


Abbildung 682: Geigenplot mit Merkmalen der Qualitätskontrolle (Beispielhaft Spenderin 1)

A: Mediane Anzahl an Genen pro Zelle. Es wurden nur Einzelzelldaten, welche zwischen 200 und 3.500 detektierten Genen (pro Zell-assoziiertem *Barcode*) aufwiesen (Kennzeichnung durch schwarze Trennlinien), mit in die Gesamtauswertung aufgenommen.

B: Medianer Anteil an UMIs in den einzelnen Zellen. Ein Minimum von 200 UMIs (schwarze Trennlinie) wurde als weiteres Filterkriterium für den Einbezug der Einzelzelldaten festgelegt.

C: Verteilung der Zellen anhand deren Anteil von exprimierten mitochondrialen Genen. Ein prozentualer Anteil der mitochondrialen Gene von unter 5 % wurde als Grenzwert (schwarze Trennlinie) für den Einbezug der Einzelzelldaten in die Gesamtauswertung ausgewählt.

Tabelle 5: Qualitative Parameter der Einzelzell-Sequenzierung unter Angabe von Referenzwerten der verwendeten Analyse-Software (*Cell Ranger*)

Probenname	Geschätzte Anzahl der enthaltenen Zellen	Durchschnittliche Anzahl der Reads pro Zelle	Validität der zugeordneten Barcodes	Anteil intrazellulärer Reads	Zuordnung der Reads zum Genom	Anzahl UMIs pro Zelle (Median)	Anzahl Gene pro Zelle (Median)
1 (0 h)	3.325	44.814	97,4%	90.6%	96,9%	5.405	2.352
1 (2 h)	3.673	44.977	97,5%	88.8%	97,3%	6.675	2.259
1 (4 h)	3.566	54.431	97,6%	89.8%	97,3%	7.262	2.326
1 (8 h)	4.069	47.288	97,6%	89.9%	97,3%	7.068	2.409
2 (0 h)	3.962	39.386	97,5%	88.7%	97,0%	6.298	2.554
2 (2 h)	4.410	43.030	97,7%	91.1%	96,6%	6.762	2.210
2 (4 h)	5.587	37.757	97,8%	91.7%	97,3%	7.053	2.206
2 (8 h)	4.512	38.498	97,6%	90.3%	97,2%	7.740	2.426
3 (0 h)	3.172	75.298	96,8%	85.4%	96,6%	7.566	2.949
3 (2 h)	4.588	38.293	97,2%	88.8%	96,9%	6.515	2.190
3 (4 h)	4.364	40.878	96,9%	86.4%	97,5%	6.594	2.156
3 (8 h)	3.844	34.828	97,0%	86.9%	97,4%	6.423	2.099
4 (0 h)	3.236	57.249	97,2%	88.4%	96,4%	6.059	2.606
4 (2 h)	3.549	48.915	96,9%	90.5%	97,1%	5.907	2.044
4 (4 h)	3.859	41.218	97,1%	89.8%	97,4%	5.857	2.011
4 (8 h)	4.127	61.981	97,1%	89.0%	96,7%	7.337	2.320
Referenzwerte anhand des Cell Ranger-Systems (10x Genomics)	i.d.R. geringer als tatsächlich eingesetzte Zellzahl (hier: 6000)	>20.000	>75%	>70%	>85%	Variabel (abh. Zelltyp und Sequenziertiefe)	Variabel (abh. Zelltyp und Sequenziertiefe)

Zur qualitativen Bewertung der Sequenzierungsdaten kann zudem die geschätzte Anzahl der untersuchten Einzelzellen betrachtet werden. Dabei bezieht sich die Auswertung auf die Anzahl der *barcodes*, welche sicher mindestens einer Zelle zugeordnet werden kann. Die *barcodes* werden den einzelnen *droplets/GEMs* zugeteilt, in denen die Zellen einzeln vorliegen. Diese lagen im vorliegenden Falle in einem Bereich zwischen 3.172 und 5.587 und somit unter der tatsächlich eingesetzten Anzahl von 6.000 Zellen pro Ansatz. Dies entspricht technisch bedingt den Erwartungen und liegt in der Regel daran, dass nicht immer wie gewünscht pro *droplet/GEM* nur 1 Zelle isoliert wird, sondern zum Teil mehrere Zellen pro GEM vorliegen (auf engl. *cell multiplets*) und dementsprechend mehrere Zellen einem *barcode* zugeordnet sind. Die durchschnittliche Anzahl an *Reads* pro Zelle definiert ebenfalls die Qualität der Ergebnisse, wobei nach den Maßstäben der verwendeten Analysesoftware und bei einer guten Probenqualität mindestens 20.000 *Reads* pro Zelle erwartet werden können. Berechnet wird dieser Wert, indem die Gesamtanzahl der *Reads* während der Sequenzierung

durch die Anzahl der enthaltenden Zellen dividiert wird (sogenannte Sequenziertiefe). Es wurden minimal 34.828 und maximal 75.298 *Reads* pro Zelle generiert, womit die Mindestanzahl von 20.000 erfüllt wurde. Ebenfalls als Zellqualitätskontrolle dient der Anteil der intrazellulären *Reads*, wobei hier die Anzahl an *Reads* gemeint ist, welche einen validen *barcode* umfassen. Dies sollte erwartungsgemäß bei mindestens 70 % der *Reads* zutreffen, wobei in der vorliegenden Einzelzell-Sequenzierung die Anzahl der intrazellulären *Reads* in einem Rahmen zwischen 85 und 92 % lag. Die Qualität der Sequenzierung kann weiterhin über die Validität der zugeordneten *barcodes* überprüft werden, welche bei mindestens 75 % liegen sollte. Hierbei werden die *barcodes* nach Sequenzierung mit einer *white list* auf Übereinstimmung verglichen, in welcher die bekannten *barcodes* Sequenzen hinterlegt sind. Hier lag die Validität der *barcodes* zwischen 97 und 98 % und somit deutlich über den vorgegebenen 75 %. Die Qualität des Mappings kann über die Anzahl der *Reads*, welche zu dem Genom zugeordnet werden können, beurteilt werden, da diese über 85 % betragen sollte. Hier konnten bei jeder Probe mindestens 96 % und maximal 98 % der *Reads* dem Genom zugeordnet werden. Insgesamt kann somit auf eine hohe Qualität der resultierenden Sequenzierungsdaten geschlossen werden.

5.3 Analyse von zelltyp-spezifischen Einzelzell-Expressionsmustern

In den folgenden drei Abschnitten werden die Ergebnisse der Zeitverlaufsstimulation bezüglich der verschiedenen Expressionsmuster der PBMC-Subtypen aufgegriffen. Im Folgenden sollen verschiedene der zell-spezifischen Marker und die daraus resultierende Zell-Typ Zuordnung der PBMCs während des Zeitverlaufs evaluiert werden. Zusätzlich werden beispielhaft anhand verschiedener Gene die Differenzierung der T-Helfer-Zellen im Rahmen der Immunzellaktivierung betrachtet. Abschließend wird auf die Expressionsrate verschiedener Gene, welche eine Rolle in der Immunaktivierung spielen, eingegangen.

5.3.1 Vergleich von zelltyp-spezifischen Markern und der resultierenden PBMC-Zelltyp-Zuordnung zum 0, 2, 4 und 8 h Zeitpunkt

Die sequenzierten Zellen wurden mittels zelltypischer Marker in Cluster aufgeteilt. Diese konnten durch die Detektion der zugehörigen Transkripte definiert werden. In Abbildung 10 ist die ganzheitliche Verteilung der verschiedenen Zelltypen während des Zeitverlaufs in Cluster mittels UMAP zusehen. Anhand dieser Darstellung kann eine Aussage über die Aufteilung der verschiedenen Subtypen der PBMCs während der unterschiedlichen Zeitpunkte getroffen werden.

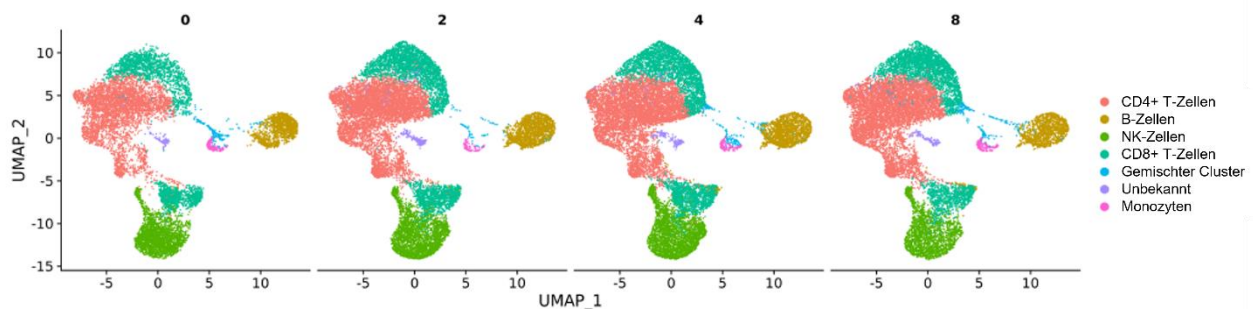


Abbildung 10: UMAP-Darstellung der PBMCs während der verschiedenen Zeitpunkte der Aktivierung (0, 2, 4 und 8h)

Die Subtypen der PBMC sind in verschiedenen Farben als Cluster dargestellt. Von links nach rechts sind die verschiedenen Zeitpunkte der Zeitverlaufsuntersuchung abgebildet.

Wie in Abbildung 10 dargestellt konnten als Resultat der Zeitverlaufsstimulation Unterschiede in der Größe und Definierbarkeit der jeweiligen Cluster festgestellt werden. Zu dem Zeitpunkt 0 h (vor der Aktivierung der Immunzellen) war insgesamt eine undeutlichere Aufteilung der unterschiedlichen PBMC-Zelltypen im Vergleich zu den Zeitpunkten der Immunaktivierung erkennbar. Die zelluläre Zuordnung der Zeitpunkte 2, 4 und 8 Stunden nach Aktivierung zeigte hingegen eine dichtere und deutlichere Cluster Darstellung. Dies ist insbesondere anhand des Clusters der CD4+ T-Zellen (rot) erkennbar, bei dem bereits ab dem 2 h Zeitpunkt die Menge der zugeordneten Zellen und damit die Dichteverteilung innerhalb des Clusterdarstellung

deutlich zunahm. Die maximale Dichte schien dabei zum 4 h Zeitpunkt aufzutreten. Insgesamt schien auch die Abgrenzung im äußeren Bereich des Clusters im Anschluss an die Stimulation stärker definiert zu sein als zum 0 h Zeitpunkt. Ähnliches galt für die CD8⁺ T-Zellen (dunkelgrün). Die B-Zellen (braun) schienen bereits 2 Stunden nach Aktivierung die höchste Cluster-Dichte zu besitzen. Die Anzahl der NK-Zellen (hellgrün) erschien zu dem Zeitpunkt 8 Stunden nach Aktivierung leicht verringert im Vergleich zu den früheren 2 und 4 Stunden Zeitpunkten der Aktivierung. Das Cluster der Monozyten (pink) zeigte einen leichten Zuwachs im Verlauf der 8 Stunden. Zu erwähnen sind außerdem die Cluster, die anhand von unspezifischen Expressionsprofilen mit mehr als einem PBMC-Zelltyp zugeordnet werden konnten (gemischt; blau). Im Verlauf verringert sich der Anteil des gemischten Clusters, was auf eine höhere Spezifität der Einzelzell-Expressionsmuster hindeuten könnte. Die Anzahl der Zellen, welche keiner Subgruppe zugeordnet werden konnten (unbekannt; lila), war im Vergleich zu den anderen Clustern durchgängig gering.

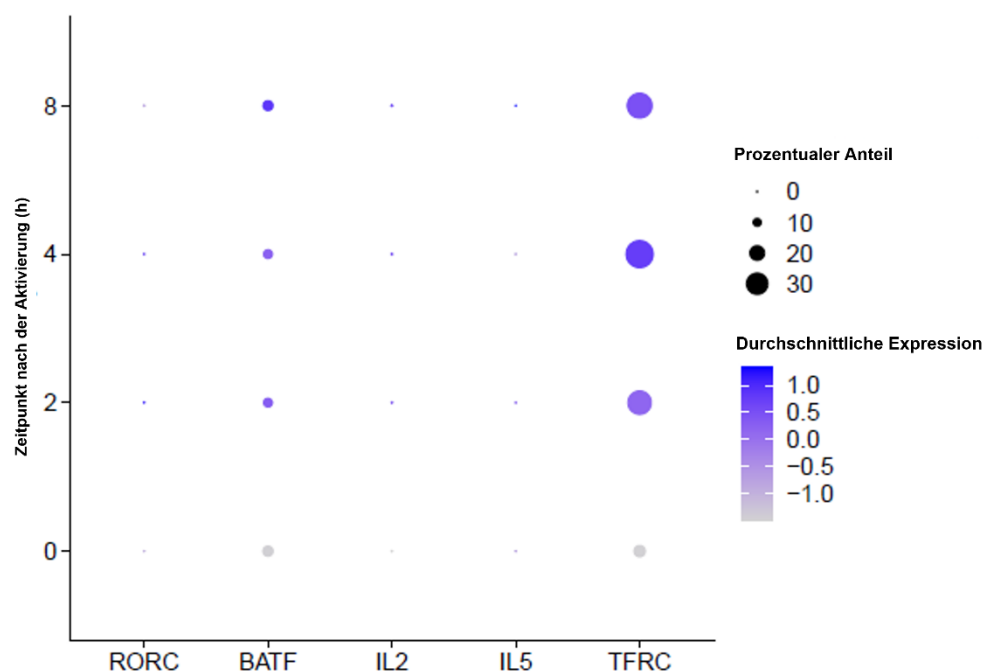


Abbildung 11: Expressionsverhältnis ausgewählter Marker von T-Helfer-Zellen während der verschiedenen Zeitpunkte der Aktivierung

Auf der X-Achse sind die ausgewählten Marker der T-Helferzellen dargestellt. Auf der Y-Achse sind die Zeitpunkte 0, 2, 4 und 8 h angegeben. Das Vorliegen der Marker zu den verschiedenen Zeitpunkten wird durch die durchschnittliche Expression und den prozentualen Anteil der exprimierenden Zellen aller Zellen charakterisiert. Die durchschnittliche Expression bezieht sich auch auf alle Zellen.

Beispielhaft wurden die T-Helferzellen bezüglich ihrer Zuordnung in weitere Subgruppen analysiert. Dafür wurde eine Auswahl an spezifischen Markern und deren Expression in den T-Helferzellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten betrachtet. In Abbildung 11 ist beispielhaft die Zeitverlaufsexpression ausgewählter Marker von T-Helfer-Zellen im nicht-aktivierten Zustand und 2, 4 und 8 Stunden nach Aktivierung aufgezeigt.

Für die Differenzierung zu Th17 T-Helfer-Zellen sind die Transkriptionsfaktoren ROR γ und ROR γ t essenziell, welche durch das Gen *RORC* kodiert werden [31]. Die Expression von RORC mRNA konnte geringgradig gesteigert zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden nachgewiesen werden. Da der Anteil der exprimierenden Zellen sehr gering war, wurde der prozentuale Anteil der betroffenen Zellen in Abbildung 11 als annähernd 0 % dargestellt. Der Transkriptionsfaktor BATF (basic leucine zipper ATF-like) wird durch eine Reihe von T-Helferzellen exprimiert, unter anderem von TFH [21], TH2 und Th17 Zellen [82]. Die durchschnittliche Expression stieg ab dem Zeitpunkt 2 Stunden im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor der Aktivierung stetig an und erreichte nach 8 Stunden die höchste Expressionsrate. Die Anzahl der exprimierenden Zellen bleibt dabei mit circa 10 % konstant. IL-2 spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von T-Helfer-Zellen, vor allem den TH1 und TH2 Zellen, da es einen großen Einfluss auf die exprimierten Zytokin-Rezeptoren IL-12R β 2 und IL-4R α hat [65]. Während die Differenzierung zu TH1 und TH2 Zellen durch IL-2 gefördert wird, werden Th17 Zellen in ihrer Reifung supprimiert [65]. Das Zytokine IL-5 wird vorrangig von TH2 Zellen sezerniert [73]. Die Expressionsrate von IL-2 stieg im Verlauf der 8 Stunden leicht an, während die Expressionsrate von IL-5 erst zwischen den Zeitpunkten 4 und 8 Stunden eine leichte Steigerung aufwies. Da auch hier wieder nur ein sehr geringer Anteil der Zellen eine Expression aufwiesen, wurde der prozentuale Anteil mit annähernd 0 % dargestellt. *TFRC* kodiert für den Transferrin Rezeptor 1 (TFR1), welcher eine wichtige Rolle im Eisen-Metabolismus spielt [3]. Neben einer Vielzahl von Funktionen fördert TFR1 unter anderem die Proliferation von T-Helfer-Zellen [3]. Die Expression von *TFRC* stieg während der Immunaktivierung deutlich an, wobei nach 8 Stunden 30 % der T-Helfer-Zellen eine Expression aufwiesen.

Insgesamt zeigten TH1, TH2 und Th17 spezifische Marker eine erhöhte Gen-Expression während der Aktivierung im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Weitere Marker der T-Helfer-Zellen wiesen keine erhöhte Expression auf, was auf eine zu geringe Anzahl an Zellen zurückzuführen ist.

5.3.2 Identifizierung der Gene mit den stärksten Zeitverlaufsveränderungen

Im Folgenden werden in Abbildung 12 die Gene spezifiziert, die im Rahmen des Zeitverlaufs der Immunaktivierung die stärkste Expressionsveränderung aufwiesen. Zum einen sind in Abbildungsteil A Gene aufgelistet, deren Expressionsrate im Vergleich zum Zeitpunkt 0 während des Zeitverlaufs deutlich zurück ging (um mehr als -1.5). Zum anderen sind in Abbildungsteil B Gene dargestellt, deren Expressionsrate im Vergleich zum Zeitpunkt 0 deutlich zunahm (um mehr als 1.5). Der Signifikanzwert (p-Wert) lag jeweils unter 0.05.

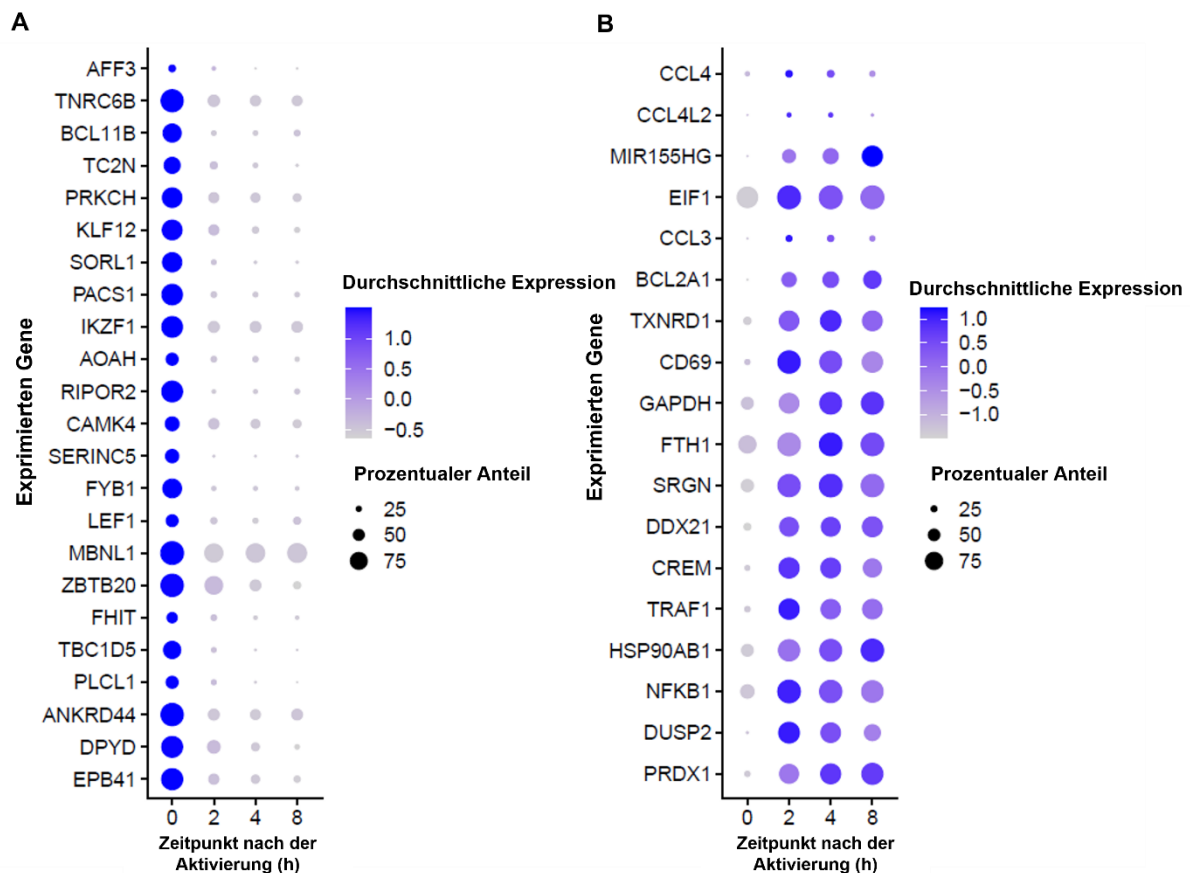


Abbildung 12: Expressionsverhältnis bestimmter Gene während der Aktivierung

A: Anhand der Einzelzellsequenzierungsdaten wurden Gene identifiziert, deren Expressionsverhältnis sich nach Stimulation um mehr als -1.5 geändert hat. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil der Zellen, welche das jeweilige Gen aktiv exprimieren, an den insgesamt untersuchten Zellen aufgeführt.

B: Anhand der Einzelzellsequenzierungsdaten wurden Gene identifiziert, deren Expressionsverhältnis sich nach Stimulation um mehr als 1.5 geändert hat. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil der Zellen, welche das jeweilige Gen aktiv exprimieren, an den insgesamt untersuchten Zellen aufgeführt.

Es wurde immer der Vergleich zwischen dem Zeitpunkt 0 (vor der Aktivierung) und dem jeweiligen Zeitpunkt nach Aktivierung (2, 4 oder 8 h) bezüglich der Expressionsrate gezogen. Die durchschnittliche Expression bezog sich auf alle Zellen der Gruppe.

Der p-Wert lag bei allen in der Graphik dargestellten Ergebnissen unter 0.05.

Beispielhaft wird im Folgenden auf vier Gene und deren Expressionsrate innerhalb des Zeitverlaufs von 8 Stunden eingegangen.

Bei verringerter Expressionsrate sank auch bei vielen Genen der prozentuale Anteil der Zellen, welche die Gene exprimierten. So wurde *CAMK4* (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV [68]) vor der Aktivierung bei ca. 50 % der Zellen exprimiert. Zwei Stunden nach der Aktivierung sank die Expressionsrate deutlich und der Anteil der *CAMK4* positiven Zellen nahm während des untersuchten Zeitraumes ebenfalls ab. *CAMK4* beeinflusst die Expansion der folliculären T-Helfer-Zellen und deren spezifischen Transkriptionsfaktor BCL6 (B cell lymphoma 6) über den sogenannten cAMP responsive element modulator α (*CREM α*) [68]. Ein weiteres Gen, welches nach der Aktivierung einen deutlichen Rückgang der mRNA-Expressionsrate und des prozentualen Anteils der Zellen, welches das Gen aktiv exprimieren, aufweist, ist *BCL11B*. Dieses kodiert für ein C₂H₂ Zinkfinger Protein [6] und spielt eine wichtige Rolle bei mehreren Schritten der T-Zell-Entwicklung und -Reifung [6]. Funktionell trägt die Expression von *BCL11B* in reifen T-Zellen zu der Regulation von Ausbreitung und Funktion der zytotoxischen T-Zellen bei [6]. Des Weiteren wird durch die Expression von *BCL11B* die plastische Veränderung von Th17 Zellen verhindert und die supprimierende Wirkung der Treg Zellen kontrolliert [6]. Bei den meisten Genen, welche während der Aktivierung von PBMCs eine steigende Expressionsrate zeigten, erhöhte sich auch der prozentuale Anteil der Zellen, welche das Gen aktiv exprimierten. Es lagen deutliche Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes mit der höchsten Expressionsrate vor. So stieg beispielsweise bei *MIR155HG* die Expressionsrate mit der Zeit immer weiter an und zeigte nach 8 Stunden den höchsten Wert. Der *MIR155HG* Locus kodiert für das Vorläufer-Transkript der microRNA-155, welche vorrangig immunspezifische Transkripte reguliert [75]. Einen besonders deutlichen Expressionsanstieg erfährt die microRNA-155 im Rahmen der CD4⁺ T-Zellen Aktivierung [24]. Zu den Zielgenen, welche durch die microRNA-155 reguliert werden, gehören beispielsweise *S100B*, ein Calcium Bindeprotein als Teil von Calcium-gesteuerten Signalwegen, oder *LAT2*, ein Transmembranadaptor, welcher in der Feinregulierung der Lymphozyten Aktivierung zum Einsatz kommt [24]. Eine erhöhte Expression der microRNA-155 wird durch die Anwesenheit von proinflammatorischen Signalmolekülen ausgelöst [75]. Andere Gene wiederum, wie *NFKB1*, wiesen nach 2 Stunden die höchste Expressionsrate auf, welche im weiteren Verlauf wieder leicht absank. *NFKB1* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1) ist Teil der NF- κ B Transkriptionsfaktor Familie und hat einen Einfluss auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, welche bei der Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen eine wichtige Rolle spielen [14]. Es liegt nachweislich ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des NF- κ B Transkriptionsfaktor und der vermehrten Transkription von *MIR155HG* vor [75].

6. Diskussion

Die Gruppe der PBMCs spielt als Teil des Immunsystems eine wichtige Rolle für die Abwehr von Erregern im menschlichen Körper [29]. Nach Kontakt mit körperfremden Antigenen werden diese Immunzellen aktiviert und starten eine Immunreaktion [38]. Die genauere Erforschung der PBMC-Aktivität kann wichtige Hinweise auf immun-gekoppelte Veränderungen im Rahmen von Infektionen [1], aber auch pathogenen Veränderungen wie Krebs oder auf neurogene Erkrankungen liefern [61][46]. Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung bietet, als eine der neusten molekular-biologischen Untersuchungsmethoden, die Möglichkeit für eine detaillierte Aufschlüsselung der zugehörigen Signalketten [1].

6.1 Etablierung einer Methodik zur schrittweisen Verarbeitung von PBMCs

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit bestand in der Erprobung eines Versuchsprotokolls, bei dem PBMC-Zellproben nach definierten Arbeitsschritten zwischengelagert werden können. Dies soll künftig die komplexen Arbeitsabläufe zur Analyse von PBMC-Aktivierungsmustern mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung erleichtern.

Im Rahmen des zu testenden Protokolls sollten die PBMCs zunächst aus frischen menschlichen Blutproben isoliert und anschließend in kryokonserviertem Zustand zwischengelagert werden. Anhand der Auszählung der aufgetauten Zellproben und unter Färbung toter Zellen mit dem Azofarbstoff Trypan-Blau, konnte für die kryokonservierten Proben der vier untersuchten Spenderinnen nach einer Lagerungsdauer zwischen 70 bis 77 Tagen ein Anteil vitaler Zellen von mehr als 80 % ermittelt werden. Diese hohe Vitalitätsrate spricht somit für die besondere Eignung des verwendeten DMSO-basierten Kryomediums zur Zwischenlagerung der PBMC-Proben.

Vorangegangene Studien liefern zudem Belege dafür, dass durch die Kryokonservierung mit DMSO-haltigen Medien keine grundlegenden Veränderungen der zellulären RNA-Expressionsprofile zu erwarten sind [30]. In diesem Zusammenhang konnten nach der Einzelzell-Sequenzierung von frisch gewonnenen PBMCs und für eine Woche kryokonservierten PBMCs keine relevanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Reads und der exprimierten Gene aufgedeckt werden [30]. Im vorliegenden Versuch wurden PBMCs für einen deutlich längeren Zeitraum von 10 bzw. 11 Wochen kryokonserviert. Auf Grundlage von Untersuchungen an der Nieren-Zelllinie HEK293 wäre allerdings auch für eine längere Lagerungsdauer in DMSO-basierten Kryomedium von bis zu 15 Wochen nicht von größeren

Einflüssen auf die Gen Expressionen auszugehen [80]. Als Gegenstand zukünftiger Untersuchungen könnten vertiefende Analysen auf Grundlage des hier getesteten Konservierungsmediums nochmals genaueren Aufschluss über den zeitlichen Fortbestand der zellulären Vitalität von PBMCs und den möglichen Einfluss einer längeren Lagerungsdauer auf die resultierenden RNA-Expressionsprofile liefern.

Zur Induktion und Analyse von aktivierungs-assoziierten Signalkaskaden sollten die Zellen nach dem Auftauen im nächsten Schritt des Protokolls mittels PMA/Ionomycin stimuliert und Zellproben über einen Zeitraum von insgesamt acht Stunden gesammelt werden. Anhand von Färbungen und der durchflusszytometrischen Analyse der resultierenden Zeitverlaufs-Zellproben lagen sowohl der repräsentative Anteil der CD4+ T-Zellen als auch der CD8+ T-Zellen innerhalb des zu erwartenden Referenzbereiches eines gesunden Erwachsenen (nach [77]). Zudem konnte auf Grundlage eines frühen Anstiegs der CD69+ Oberflächenexpression innerhalb der T-Zell-Subpopulationen die erfolgreiche Induktion der Immunzellaktivierung exemplarisch bestätigt werden. In weiterführende Studien könnte auch bei anderen Zelltypen der PBMCs die erfolgreiche Aktivierung nachgewiesen werden. Dies wäre beispielsweise bei Monozyten ebenfalls mithilfe einer vermehrten CD69+ Oberflächenexpression, aber auch durch eine erhöhte CD68+ Oberflächenexpression sichtbar [42]. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kontrolle der B-Zell-Aktivierung durch die Darstellung der erhöhten Expression des Gens *TSPAN33* (Tetraspanin 33), welches nur bei aktivierten B-Zellen verstärkt exprimiert wird [52].

Vor der finalen Sequenzierungsanalysen sollten die resultierenden Zeitverlaufsproben im nächsten Stadium des zu testenden Protokolls mithilfe eines Methanol-basierten Verfahrens fixiert und erneut zwischengelagert werden. Auf Grundlage von vorangegangenen Studien stellt die Methanol Fixierung im Zusammenhang mit Einzelzell-Sequenzierungsanalysen eine geeignete Methode zur Zwischenlagerung von Zellproben dar [4][17][78]. Untersuchungen von Wang et al. an humanen Darm- und Leber-Zelllinien (HCT-116 und HepG2) konnten im Vergleich zu frischen Zellen allerdings einen Einfluss der Methanol-Fixierung auf zelluläre Transkripte mit geringer Ausgangsexpression zeigen [78]. Dies könnte gerade bei der Analyse von PBMCs ein möglicher Nachteil sein, da hier einige Zellen wie die dendritischen Zellen mit 1 bis 2 % Anteil der PBMCs in nur geringen Mengen vorliegen [38]. Die sowieso schon nur vereinzelt vorliegenden charakteristischen Transkripte dieser Zellgruppe könnten somit verloren gehen. Im Gegensatz zu der durch Wang et al. beschriebenen Methodik, wurden die fixierten Zellproben im vorliegenden Versuch zur Vorbereitung auf die Sequenzierungsanalyse nicht mittels Phosphatgepufferter Kochsalzlösung sondern mithilfe einer Natriumcitrat-basierten Salzlösung rehydriert (nach Chen et al.; [17]). Durch diese kann nachweislich nicht nur die Degradierung der RNA verhindert werden, sondern auch der Verlust von zytoplasmatischer RNA nach der Entfernung des fixierenden Mittels [17]. Somit lassen sich

die Ergebnisse der Studie von Wang et al. nicht uneingeschränkt mit den vorliegenden Untersuchungen vergleichen. Eine mögliche Alternative zur Methanol-Fixierung stellt die Verwendung von DMSO dar.

Wohnhaas et al. verglich diese beiden Fixierungsmethoden bezüglich der Qualität der Ergebnisse, welche bei nachfolgender Analyse mittels Einzelzell-Sequenzierung erzielt wurden [80]. Es wurde eine Einzelzell-Sequenzierung bei der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 und der murinen embryonalen Fibroblasten- Zelllinie 3T3 jeweils an frischen Zellen, an mittels DMSO kryokonservierten und durch Methanol fixierten Zellen durchgeführt [80]. Zellen, welche anhand des DMSO Protokolls bearbeitet wurden, zeigten ein sehr ähnliches Genexpression Profil wie frische Zellen [80]. Methanol fixierte Zellen dagegen wiesen eine erhöhte Anzahl an mitochondrialen Genen in der Einzelzell-Sequenzierung auf [80], was als Hinweis einer schlechteren Qualität gewertet wird [23]. Da bei den Untersuchungen durch Wohnhaas et al. keine PBMCs verwendet wurden und analog zur Studie von Wang et al. keine Natriumcitrat-basierten Salzlösung für die Rehydrierung der Zellproben verwendet wurde, kann keine sichere Aussage über die Überlegenheit der DMSO-Methodik bei der Konservierung von PBMC-Zeitverlaufsproben für die vorliegende Arbeit abgeleitet werden. Dies bietet die Möglichkeit fortführender Studien über vergleichende Analysen zwischen DMSO und Methanol Protokolle, um die optimale Methodik zur Lagerung von PBMC-Zeitverlaufsproben zu ermitteln.

Als Ergebnis der finalen Sequenzierungsanalysen sollten die resultierenden Datensätze schließlich anhand verschiedener qualitativer Parameter beurteilt werden. Ein sehr geringer Anteil an Zellen, welche anhand der Expression von mitochondrialen Genen mit zellulärem Stress auf die Behandlung vor der Sequenzierungsanalyse reagierten [23] spricht in besonderer Weise für die Integrität der zellulären Ausgangsproben im Rahmen der zu testenden Methodik. Daneben gelten die Anzahl der Gene sowie die Anzahl der UMIs pro Zelle als zwei der wichtigen Kriterien zur Beurteilung der Proben- und Daten-Qualität [25]. Eine außergewöhnlich hohe Anzahl an Genen pro Zelle wird im Rahmen von Einzelzell-Sequenzierungsanalysen in der Regel als Hinweis auf eine reduzierte Probenqualität gewertet [72]. Ebenso werden Datensätze, welche weniger als 200 bis 300 UMIs pro Zelle aufweisen als qualitativ mangelhaft betrachtet [34] und gelten als Hinweis auf vorangegangene Zellschäden [72]. Anhand der im Ergebnisteil beschriebenen Evaluierung der vorliegenden Sequenzierungsdaten musste nur ein sehr geringer Anteil der untersuchten Einzelzellen auf Grundlage der empfohlenen Grenzwerte für Gene und UMIs pro Zelle von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen werden. Als Gesamtergebnis für alle untersuchten Spender und Zeitpunkte, lag die mediane Anzahl an Genen pro Zelle für die final eingeschlossenen 57.375 Einzelzell-Datensätze in einem Bereich zwischen 2.011 und 2.949, was anhand von

vorangegangenen Studien mit frisch isolierten PBMCs in etwa der zu erwartende Anzahl entsprach [23]. Daneben lag die mediane Anzahl an UMIs pro Zelle in einem Rahmen zwischen 5.405 und 7.740, was im Vergleich zu anderen Studien mit frischen PBMCs ebenfalls innerhalb des zu erwartenden Bereichs von 800-15.000 lag [25][34].

Insgesamt konnte auf Grundlage einer hohen Zellvitalität, der erwartungsgemäßen Verteilung T-zellulärer Subtypen und anhand der Evaluierung der resultierenden Einzelzell-Sequenzierungsdaten eine hohe Probenqualität nachgewiesen werden. Auf Basis der vorliegenden Daten ist somit von der Eignung des zu testenden Protokolls für die Analyse von PBMC-Einzelzell-Aktivierungsmustern auszugehen.

6.2 Identifizierung spezifischer Zelltypen mittels *in vitro* Aktivierung

Im Anschluss an die Sequenzierungsanalyse und im Rahmen der bioinformatischen Prozessierung werden die Einzelzelldaten über die Expression von spezifischen molekularen Markern den in der Probe enthaltenen Zelltypen zugeordnet [61]. Im Falle der PBMCs kann dies aufgrund der geringen Ausgangsexpression von charakteristischen Molekül-Markern für manche Zelltypen eine Herausforderung darstellen [47]. Durch die *in vitro* Behandlung mit Stimulanzen wie PMA/Ionomycin kann die PBMC-Aktivierung artifiziell ausgelöst und in Folge dessen eine verstärkte Produktion von zelltyp-spezifischen Molekül-Markern, wie beispielsweise Zytokinen, induziert werden [38]. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit bestand auf Grundlage dessen darin zu erproben, ob im Rahmen von Einzelzell-Sequenzierungsanalysen eine genauere Aufschlüsselung der spezifischen PBMC-Subtypen durch eine zuvor induzierte *in vitro* Aktivierung erreicht werden kann.

Da die Daten der Einzelzell-Sequenzierung multidimensional sind, wurden diese für die Visualisierung dimensional reduziert und anhand der Gen Expression Profile in Clustern dargestellt. Hierbei wurde deutlich, dass zum 0 Stunden Zeitpunkt (vor der Aktivierung der PBMCs) die Größe und Definierbarkeit der verschiedenen Cluster im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten nach Aktivierung der PBMCs geringer war. Die Cluster der T-Zellen wiesen zum 4 Stunden Zeitpunkt die höchste Dichte auf, bei den B-Zellen war dies bereits nach 2 Stunden der Fall. Die Zuordnung der NK-Zellen war zu den früheren 2 und 4 Stunden Zeitpunkten deutlicher, die der Monozyten eher im Verlauf der 8 Stunden. Die Anzahl der unspezifischen Expressionsprofilen sank im Verlauf, was auf eine höhere Spezifität der Einzelzell-Expressionsmuster hindeuten könnte. Im Vergleich zur Testung von unstimulierten Zellproben scheint die *in vitro* Aktivierung der PBMCs somit insgesamt eine effizientere Zuordnung der enthaltenen Zelltypen zu ermöglichen. Im Hinblick auf künftige Studien

erscheint insgesamt ein Zeitintervall zwischen 4 und 8 Stunden nach Aktivierung besonders aussagekräftig. In Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung könnten jedoch auch frühere Zeitpunkte nach der Stimulation betrachtet werden, zum Beispiel wenn ein besonderer Fokus auf der Funktionalität der NK-Zellen als Subtypus der PBMCs liegen sollte.

Beispielhaft wurde die T-Helferzellen und deren Zuordnung in weitere Subgruppen anhand spezifischer Marker und deren Expression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten genauer betrachtet. Die Expression von TFRC, welches die Proliferation von T-Helfer-Zellen fördert [3], stieg während der Immunaktivierung deutlich an, wobei nach 8 Stunden 30 % der T-Helfer-Zellen eine Expression aufwiesen. Die RORC und BATF Transkriptionsfaktoren können als Marker für Th17 T-Helfer-Zellen herangezogen werden [31]. Im Falle der RORC mRNA konnte zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden eine etwas gesteigerte Expression nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Expression des Transkriptionsfaktors BATF erreichte erst nach 8 Stunden die höchste Expressionsrate, wobei die Anzahl der exprimierenden Zellen mit circa 10 % konstant blieb. Die Expressionsrate von IL-2, welches die Differenzierung zu TH1 und TH2 fördert [65], stieg im Verlauf der 8 Stunden leicht an, während die Expressionsrate von IL-5, welches vorrangig von TH2 Zellen sezerniert wird [73], erst zwischen den Zeitpunkten 4 und 8 Stunden eine leichte Steigerung aufwies. Insgesamt zeigten TH1, TH2 und Th17 spezifische Marker somit eine erhöhte Gen-Expression während der Aktivierung im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Da der gewählte Zeitraum von 8 Stunden zu kurz für die vollständige Differenzierung von T-Zellen ist, die in der Regel eine Stimulation von 24 Stunden voraussetzt [35], sollte es sich hier bei der Aufschlüsselung der Subtypen um bereits vorliegende differenzierte T-Zellen handeln. Die *in vitro* Aktivierung fördert also die bessere Aufschlüsselung der Subtypen und kann bei zukünftigen Studien als Hilfestellung genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die *in vitro* Aktivierung ein Gemisch aus PMA und Ionomycin genutzt, welches intrazellulär die Induktion von Ca^{2+} -abhängigen Signalketten und eine synergistische Stimulation der PKC-Aktivität bewirkt [16]. Eine weitere Möglichkeit für die *in vitro* Aktivierung besteht beispielsweise in der Verwendung von Lipopolysacchariden (LPS) [45]. LPS ist ein Endotoxin, welches als verbindendes Element in der Zellwand von gramnegativen Bakterien eine inflammatorische Reaktion bei Kontakt mit wirtseigenen Zellen auslöst [76]. Zu den LPS reaktiven Zellen zählen vor allem die Monozyten, welche in Folge dessen vermehrt proinflammatorische Zytokine ausschütten und zudem die T-Zell-Aktivierung über ihre Zell-Zell-Kontakte stimulieren [44] [76]. Des Weiteren werden auch B-Zellen und NK-Zellen durch die LPS-Behandlung stimuliert [13] [36]. Je nach Fragestellung wäre außerdem eine Antigen-spezifische Stimulation der PBMCs denkbar, wobei hier gezielt bestimmte Zellen

durch zellspezifische Antigene aktiviert werden [12]. So könnte beispielsweise eine Stimulation mit α -Synuclein Monomeren zur Untersuchung von Immun-assoziierten Prozessen in Zusammenhang der Parkinson Erkrankung genutzt werden [79].

6.3 Veränderung der Expressionsdaten zwischen den Zeitpunkten

Darüber hinaus sollten am Beispiel der CD4⁺ T-Zellen die Expressionsprofile von Genen mit immunregulatorischer Funktion zu den Zeitpunkten vor und nach der Stimulation verglichen werden. Im Folgenden soll auf vier exemplarische Gene mit ausgeprägter Expressionsveränderung genauer eingegangen werden.

Zwei Gene, welche im Verlauf der Immunaktivierung sowohl eine verringerte Expressionsrate aufwiesen als auch von einem geringeren Prozentsatz an Zellen exprimiert wurden, sind *CAMK4* und *BCL11B*. Über den sogenannten *CREM α* Transkriptionsfaktor kann das zugehörige *CAMK4*-Protein die Expansion von follikulären T-Helfer-Zellen und deren spezifischen Transkriptionsfaktor BCL6 beeinflussen [68]. Des Weiteren verringert *CAMK4* die Aktivität von Treg Zellen, sodass es umgekehrt bei einer reduzierten Expression von *CAMK4* zu einer erhöhten Aktivierung von Treg Zellen führt [40]. Durch die Inhibition von *CAMK4* wird neben der verstärkten Aktivierung von Treg Zellen vermehrt IL-2 produziert, welches für die Funktion von Treg Zellen eine bedeutende Rolle spielt [39]. Die richtige Balance zwischen der Aktivität von T-Helfer-Zellen und der Regulierung der Immunantwort durch Treg Zellen ist entscheidend für die Verhinderung von autoimmunen Prozessen, wobei diese Balance zugunsten einer vermehrten Treg Aktivierung ausfällt [40]. Die verringerte Expression von *CAMK4* war somit zu erwarten. *BCL11B* kodiert für ein C₂H₂ Zinkfinger Protein und spielt eine wichtige Rolle bei mehreren Schritten der T-Zell-Entwicklung und -Reifung, vor allem bei der Regulation von Ausbreitung und Funktion der zytotoxischen T-Zellen [6]. Dazu fördert es durch die Interaktion mit verschiedenen Co-Faktoren die Transkription von Genen wie *IL2* und *FOXP3* oder wirkt als transkriptioneller Repressor auf Gene wie *p57* und *p21*, wodurch *BCL11B* als Tumorsuppressor dient [27]. Bei erhöhter Expression von *BCL11B* wird die plastische Veränderung von Th17 Zellen verhindert und die supprimierende Wirkung der Treg Zellen kontrolliert [6]. Bei einem Verlust der *BCL11B* führt dies zu einer verminderten Ausbildung von Treg Zellen und einer unkontrollierten Immunreaktion [70]. Eine verringerte Expression von *BCL11B* führt in den frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung zu Defekten [41]. Zu späteren Zeitpunkten führt die Abwesenheit von *BCL11B* zu einer Umprogrammierung der T-Zellen zu NK-Zellen ähnlichen Zellen [41]. Zwar ist die Entwicklung der Immunzellen zum Zeitpunkt der Versuchsreihe bereits abgeschlossen, trotzdem ist die Reduktion von *BCL11B* unerwartet, da die Beteiligung von *BCL11B* nach der Aktivierung von T-Zellen im Rahmen von

Transkriptionsaktivierung und -suppression verschiedener Gene bekannt ist [18]. Je nach Halbwertszeit können manche Proteine erst nach gewisser Zeit akkurat gemessen werden [54], wodurch die Zeitspanne von 8 Stunden in dieser Zeitverlaufsuntersuchung für die Messung von *BCL11B* zu kurz sein könnte.

Eine zunehmende Expressionsrate im Zusammenhang mit der Aktivierung und ein erhöhter prozentualer Anteil der exprimierenden Zellen wiesen folgende Gene auf: *MIR155HG*, welches für das Vorläufer-Transkript der microRNA-155 kodiert und vorrangig immunspezifische Transkripte reguliert [75], und *NFKB1* als Teil der NF- κ B Transkriptionsfaktor Familie [14]. Für die microRNA-155 konnte anhand von vorangegangenen Studien ebenfalls ein Anstieg der Expressionsrate im Rahmen der CD4⁺ T-Zellen Aktivierung nachgewiesen werden. Zur Koordinierung des Aktivierungsprozesses werden Zielgene wie beispielsweise *S100B*, ein Calcium Bindeprotein als Teil von Calcium-gesteuerten Signalwegen, oder *LAT2*, ein Transmembranadaptor, welcher in der Feinregulierung der Lymphozyten Aktivierung zum Einsatz kommt, durch die microRNA reguliert [24]. Eine erhöhte Expression der microRNA-155, welche hier im Verlauf immer weiter anstieg, wird durch die Anwesenheit von proinflammatorischen Signalmolekülen wie LPS, Interleukine, Interferone und TNF ausgelöst [75]. Der Transkriptionsfaktor *NFKB1* koordiniert eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, welche vermehrt Immunzellen aktivieren und rekrutieren [14]. Beispielsweise sind NK-Zellen in ihrer Ausreifung und Funktionsweise von *NFKB1* abhängig [49]. Aktiviert wird der Transkriptionsfaktor *NFKB1* durch eine Vielzahl an Auslösern, unter anderem proinflammatorische Zytokine, T-Zell-Rezeptor Aktivierung und B-Zell-Rezeptor Aktivierung [49]. Die Aktivierung des NF- κ B Transkriptionsfaktors führt zu einer vermehrten Aktivierung von *MIR155HG* und damit Transkription der microRNA-155, indem NF- κ B direkt an die proximale Promotorregion von *MIR155HG* bindet [75]. Die erhöhte Expressionsrate und der vermehrte prozentuale Anteil der exprimierenden Zellen bei beiden Genen entspricht somit den Erwartungen bei einer effektiven *in vitro* Aktivierung der Immunzellen.

6.4 Fazit und Ausblick

Die Zielsetzungen dieser Arbeit bestanden in der Erprobung eines mehrschrittigen Versuchsprotokolls, bei welchem Zellproben zwischengelagert wurden und der Identifizierung spezifischer Zelltypen nach Aktivierung der Immunzellen mittels Einzelzell-Sequenzierung, wobei zusätzlich die Expressionsveränderung spezifischer Gene im Rahmen eines Zeitverlaufs von 8 Stunden dargestellt wurden.

Das mehrschrittige Versuchsprotokoll beinhaltete die Zwischenlagerung der frisch gewonnen PBMCs mittels Kryokonservierung und im nächsten Schritt die Fixierung der aktivierten PBMCs mit Methanol. Durch mehrfache Qualitätskontrollen konnte insgesamt eine hohe Probenqualität bei Kombination beider Verfahren nachgewiesen werden. Zukünftig können also komplexere Versuche mit PBMCs in mehrere Arbeitsschritte aufgegliedert werden, ohne an Qualität einzubüßen. Eine vergleichende Analyse zwischen DMSO und Methanol Protokolle zur Lagerung von PBMC-Zeitverlaufsproben könnte die optimale Lagerungsmethodik eruieren.

Um die bis dahin erschwerte Aufschlüsselung der verschiedenen Zelltypen [47] zu erleichtern, wurde in dieser Arbeit eine Aktivierung der Immunzellen mittels PMA/Ionomycin vorgenommen. Die nachfolgende Einzelzell-Sequenzierung wurde mit nicht aktivierten Zellproben und mit aktivierten Zellproben nach 2, 4 und 8 Stunden durchgeführt. Anhand der Cluster Darstellung der spezifischen Zelltypen wurde ersichtlich, dass die Aktivierung eine bessere Aufschlüsselung ermöglicht. Eine vergleichende Analyse zwischen der Aktivierung durch PMA/Ionomycin und der Aktivierung mit alternativen Stimuli könnte die optimale Methodik der Zellaktivierung für die weitere Aufschlüsselung der Subtypen mittels Einzelzell-Sequenzierung eruieren.

Die Darstellung der Expressionsveränderung spezifischer Gene war bei Genen, welche einen Anstieg der Expression durch die Aktivierung erfuhren, genauer. Beispielsweise wurden spezifische Gene der T-Helfer-Zellen und deren Expressionsverhalten dargestellt, wobei TH1, TH2 und Th17 spezifische Marker eine erhöhte Gen-Expression während der Aktivierung im Vergleich zum Zeitpunkt 0 aufzeigten. Auch die genauere Betrachtung der Genexpression wird durch die Aktivierung der Immunzellen gefördert.

Insgesamt konnte ein mehrschrittiges Versuchsprotokoll mit *in vitro* Aktivierung der Zellproben für die genauere Aufschlüsselung der PBMC-Subtypen etabliert werden, welches in zukünftigen Studien mit PBMCs angewandt werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Acosta Davila JA, Hernandez De Los Rios A (2019) An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of *Toxoplasma gondii* and Other Apicomplexan Parasites. *Front Cell Infect Microbiol* 9:24
2. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H (2013) Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health* 10:3834–3842
3. Aljohani AH, Al-Mousa H, Arnaout R, Al-Dhekri H, Mohammed R, Alsum Z, Nicolas-Jilwan M, Alrogi F, Al-Muhsen S, Alazami AM, Al-Saud B (2020) Clinical and Immunological Characterization of Combined Immunodeficiency Due to TFR1 Mutation in Eight Patients. *J Clin Immunol* 40:1103–1110
4. Alles J, Karaikos N, Praktiknjo SD, Grosswendt S, Wahle P, Ruffault P-L, Ayoub S, Schreyer L, Boltengagen A, Birchmeier C, Zinzen R, Kocks C, Rajewsky N (2017) Cell fixation and preservation for droplet-based single-cell transcriptomics. *BMC Biol* 15:44
5. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, Hart M, Abu-Halima M, Grässer FA, Lenhof H-P, Keller A, Meese E (2019) An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 47:3353–3364
6. Avram D, Califano D (2014) The multifaceted roles of Bcl11b in thymic and peripheral T cells - impact on immune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950* 193:2059–2065
7. Bar-Joseph Z, Gitter A, Simon I (2012) Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nat Rev Genet* 13:552–564
8. Baust JM, Campbell LH, Harbell JW (2017) Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *Vitro Cell Dev Biol - Anim* 53:855–871
9. Bhattacharyya ND, Feng CG (2020) Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength. *Front Immunol* 11:624
10. Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:S33–S40
11. Bröker B, Schütt C, Fleischer B *Grundwissen Immunologie*. 4. Auflage edition. Springer Spektrum
12. Bronge M, Kaiser A, Carvalho-Queiroz C, Nilsson OB, Ruhrmann S, Holmgren E, Olsson T, Gafvelin G, Grönlund H (2019) Sensitive detection of antigen-specific T-cells using bead-bound antigen for in vitro re-stimulation. *MethodsX* 6:1635–1641
13. Bucala R (1992) Polyclonal activation of B lymphocytes by lipopolysaccharide requires macrophage-derived interleukin-1. *Immunology* 77:477–482
14. Cartwright T, Perkins ND, Wilson C (2016) NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* 283:1812–1822
15. Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125:S3–S23
16. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R (1989) Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol Baltim Md 1950* 143:1283–1289

17. Chen J, Cheung F, Shi R, Zhou H, Lu W (2018) PBMC fixation and processing for Chromium single-cell RNA sequencing. *J Transl Med* 16:198
18. Cismasiu VB, Ghanta S, Duque J, Albu DI, Chen H-M, Kasturi R, Avram D (2006) BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Blood* 108:2695–2702
19. Damascena HL, Silveira WAA, Castro MS, Fontes W (2022) Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells* 11:2889
20. de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C (1998) The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol Baltim Md 1950* 160:1666–1676
21. Delacher M, Simon M, Sanderink L, Hotz-Wagenblatt A, Wuttke M, Schambeck K, Schmidleithner L, Bittner S, Pant A, Ritter U, Hehlhans T, Riegel D, Schneider V, Groeber-Becker FK, Eigenberger A, Gebhard C, Strieder N, Fischer A, Rehli M, Hoffmann P, Edinger M, Strowig T, Huehn J, Schmidl C, Werner JM, Prantl L, Brors B, Imbusch CD, Feuerer M (2021) Single-cell chromatin accessibility landscape identifies tissue repair program in human regulatory T cells. *Immunity* 54:702-720.e17
22. Delves PJ, Roitt IM (2000) The Immune System. *N Engl J Med* 343:108–117
23. Derbois C, Palomares M-A, Deleuze J-F, Cabannes E, Bonnet E (2023) Single cell transcriptome sequencing of stimulated and frozen human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Data* 10:433
24. Diener C, Hart M, Kehl T, Rheinheimer S, Ludwig N, Krammes L, Pawusch S, Lenhof K, Tänzer T, Schub D, Sester M, Walch-Rückheim B, Keller A, Lenhof H-P, Meese E (2020) Quantitative and time-resolved miRNA pattern of early human T cell activation. *Nucleic Acids Res* 48:10164–10183
25. Ding J, Adiconis X, Simmons SK, Kowalczyk MS, Hession CC, Marjanovic ND, Hughes TK, Wadsworth MH, Burks T, Nguyen LT, Kwon JYH, Barak B, Ge W, Kedaigle AJ, Carroll S, Li S, Hacohen N, Rozenblatt-Rosen O, Shalek AK, Villani A-C, Regev A, Levin JZ (2020) Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nat Biotechnol* 38:737–746
26. Finotello F, Di Camillo B (2015) Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. *Brief Funct Genomics* 14:130–142
27. García-Aznar JM, Alonso Alvarez S, Bernal del Castillo T (2024) Pivotal role of BCL11B in the immune, hematopoietic and nervous systems: a review of the BCL11B-associated phenotypes from the genetic perspective. *Genes Immun* 25:232–241
28. Golubovskaya V, Wu L (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 8:36
29. Gómez-Aguililla S, Núñez C, Rubio M, Corzo M (2023) Chapter 11 - Isolation and cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells. Academic Press URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X23000067>
30. Guillaumet-Adkins A, Rodríguez-Esteban G, Mereu E, Mendez-Lago M, Jaitin DA, Villanueva A, Vidal A, Martínez-Martí A, Felip E, Vivancos A, Keren-Shaul H, Heath S,

- Gut M, Amit I, Gut I, Heyn H (2017) Single-cell transcriptome conservation in cryopreserved cells and tissues. *Genome Biol* 18:45
31. Hall JA, Pokrovskii M, Kroehling L, Kim B-R, Kim SY, Wu L, Lee J-Y, Littman DR (2022) Transcription factor ROR α enforces stability of the Th17 cell effector program by binding to a Rorc cis-regulatory element. *Immunity* 55:2027-2043.e9
 32. Hin Tang JJ, Hao Thng DK, Lim JJ, Toh TB JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncol* 7:HEP18
 33. Hoth M, Wischmeyer E (2016) *Immunsystem*. Georg Thieme Verlag KGURL: https://eref.thieme.de/ebooks/1502150#/ebook_1502150_SL62126188
 34. Jovic D, Liang X, Zeng H, Lin L, Xu F, Luo Y (2022) Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clin Transl Med* 12:e694
 35. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251–262
 36. Kanevskiy LM, Erokhina SA, Streltsova MA, Ziganshin RH, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI (2019) The Role of O-Antigen in LPS-Induced Activation of Human NK Cells. *J Immunol Res* 2019:3062754
 37. Kaszubowska L, Foerster J, Schetz D, Kmiec Z (2018) CD56bright cells respond to stimulation until very advanced age revealing increased expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2. *Immun Ageing A* 15:
 38. Kleiveland CR (2015) *Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Springer, Cham (CH). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500157/>
 39. Koga T, Ichinose K, Mizui M, Crispín JC, Tsokos GC (2012) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV suppresses IL-2 production and regulatory T cell activity in lupus. *J Immunol Baltim Md* 1950 189:3490–3496
 40. Koga T, Hedrich CM, Mizui M, Yoshida N, Otomo K, Lieberman LA, Rauen T, Crispín JC, Tsokos GC (2014) CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- α underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J Clin Invest* 124:2234–2245
 41. KOMINAMI R (2012) Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88:72–87
 42. Lambert C, Preijers FWMB, Yanikkaya Demirel G, Sack U (2017) Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 92:180–188
 43. Latchman DS (1997) Transcription factors: An overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1305–1312
 44. Lawlor N, Nehar-Belaid D, Grassmann JDS, Stoeckius M, Smibert P, Stitzel ML, Pascual V, Banchereau J, Williams A, Ucar D (2021) Single Cell Analysis of Blood Mononuclear Cells Stimulated Through Either LPS or Anti-CD3 and Anti-CD28. *Front Immunol* 12:636720
 45. Lin Z, Huang Y, Jiang H, Zhang D, Yang Y, Geng X, Li B (2021) Functional differences and similarities in activated peripheral blood mononuclear cells by lipopolysaccharide or

phytohemagglutinin stimulation between human and cynomolgus monkeys. *Ann Transl Med* 9:257

46. Lindestam Arlehamn CS, Dhanwani R, Pham J, Kuan R, Frazier A, Rezende Dutra J, Phillips E, Mallal S, Roederer M, Marder KS, Amara AW, Standaert DG, Goldman JG, Litvan I, Peters B, Sulzer D, Sette A (2020) α -Synuclein-specific T cell reactivity is associated with preclinical and early Parkinson's disease. *Nat Commun* 11:1875
47. Liu S, Trapnell C (2016) Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges. *F1000Research* 5:F1000 Faculty Rev-182
48. Lorenz C, Lünse CE, Mörl M (2017) tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules* 7:35
49. Lougaris V, Patrizi O, Baronio M, Tabellini G, Tampella G, Damiani E, Frede N, van der Meer JWM, Fliegauf M, Grimbacher B, Parolini S, Plebani A (2017) NFKB1 regulates human NK cell maturation and effector functions. *Clin Immunol* 175:99–108
50. Luecken MD, Theis FJ (2019) Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol* 15:e8746
51. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D *Der Experimentator Immunologie*. 4. Auflage edition. Springer Spektrum
52. Luu VP, Hevezi P, Vences-Catalan F, Maravillas-Montero JL, White CA, Casali P, Llorente L, Jakez-Ocampo J, Lima G, Vilches-Cisneros N, Flores-Gutiérrez JP, Santos-Argumedo L, Zlotnik A (2013) TSPAN33 is a novel marker of activated and malignant B cells. *Clin Immunol* 149:388–399
53. Mandala W, Harawa V, Munyenembe A, Soko M, Longwe H (2021) Optimization of stimulation and staining conditions for intracellular cytokine staining (ICS) for determination of cytokine-producing T cells and monocytes. *Curr Res Immunol* 2:184–193
54. Mathieson T, Franken H, Kosinski J, Kurzawa N, Zinn N, Sweetman G, Poeckel D, Ratnu VS, Schramm M, Becher I, Steidel M, Noh K-M, Bergamini G, Beck M, Bantscheff M, Savitski MM (2018) Systematic analysis of protein turnover in primary cells. *Nat Commun* 9:689
55. Miranda TB, Jones PA (2007) DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213:384–390
56. Murphy K, Weaver C (2018) *Grundbegriffe der Immunologie*. Janeway Immunol 3–46
57. Murphy K, Weaver C (2018) *Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren*. Janeway Immunol 177–220
58. Murphy K, Weaver C (2018) *Signalgebung durch Rezeptoren des Immunsystems*. Janeway Immunol 329–375
59. Nachtergaele S, He C (2018) Chemical Modifications in the Life of an mRNA Transcript. *Annu Rev Genet* 52:349–372
60. Netzker R (2016) *Transkription*. Georg Thieme Verlag KGURL: https://eref.thieme.de/ebooks/1232218#/ebook_1232218_SL53190978

61. P V, M H (2018) The impact of single-cell RNA sequencing on understanding the functional organization of the immune system. *Brief Funct Genomics* 17:265–272
62. Papavassiliou AG (1995) Transcription Factors. *N Engl J Med* 332:45–47
63. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002) Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* 108:501–512
64. Rassow J (2016) Mediatoren des Immunsystems. Georg Thieme Verlag KGURL: https://eref.thieme.de/ebooks/1232218#/ebook_1232218_SL53199471
65. Read KA, Powell MD, McDonald PW, Oestreich KJ (2016) IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4+ T helper cell differentiation. *Exp Hematol* 44:799–808
66. Rock KL, Reits E, Neefjes J (2016) Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* 37:724–737
67. Rothstein TL, Baeker TR, Miller RA, Kolber DL (1986) Stimulation of murine B cells by the combination of calcium ionophore plus phorbol ester. *Cell Immunol* 102:364–373
68. Scherlinger M, Li H, Pan W, Li W, Karino K, Vichos T, Boulougoura A, Yoshida N, Tsokos MG, Tsokos GC (2024) CaMK4 controls follicular helper T cell expansion and function during normal and autoimmune T-dependent B cell responses. *Nat Commun* 15:840
69. Scull CE, Schneider DA (2019) Coordinated control of rRNA processing by RNA polymerase I. *Trends Genet TIG* 35:724–733
70. Sidwell T, Rothenberg EV (2021) Epigenetic Dynamics in the Function of T-Lineage Regulatory Factor Bcl11b. *Front Immunol* 12:669498
71. Sonneveld S, Verhagen BMP, Tanenbaum ME (2020) Heterogeneity in mRNA Translation. *Trends Cell Biol* 30:606–618
72. Su M, Pan T, Chen Q-Z, Zhou W-W, Gong Y, Xu G, Yan H-Y, Li S, Shi Q-Z, Zhang Y, He X, Jiang C-J, Fan S-C, Li X, Cairns MJ, Wang X, Li Y-S (2022) Data analysis guidelines for single-cell RNA-seq in biomedical studies and clinical applications. *Mil Med Res* 9:68
73. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000) A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100:655–669
74. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K (2012) Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 16:400–405
75. Thompson RC, Vardinogiannis I, Gilmore TD (2013) Identification of an NF- κ B p50/p65-responsive site in the human MIR155HG promoter. *BMC Mol Biol* 14:24
76. Ulmer AJ, Flad H-D, Rietschel Th, Mattern T (2000) Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology* 152:37–45
77. Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D (2014) Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology* 219:487–496

78. Wang X, Yu L, Wu AR (2021) The effect of methanol fixation on single-cell RNA sequencing data. *BMC Genomics* 22:420
79. White AJ, Wijeyekoon RS, Scott KM, Gunawardana NP, Hayat S, Solim IH, McMahon HT, Barker RA, Williams-Gray CH (2018) The Peripheral Inflammatory Response to Alpha-Synuclein and Endotoxin in Parkinson's Disease. *Front Neurol* 9:946
80. Wohnhaas CT, Leparac GG, Fernandez-Albert F, Kind D, Gantner F, Viollet C, Hildebrandt T, Baum P (2019) DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. *Sci Rep* 9:10699
81. Young BA, Gruber TM, Gross CA (2002) Views of Transcription Initiation. *Cell* 109:417–420
82. Zhang X, Zhang C, Qiao M, Cheng C, Tang N, Lu S, Sun W, Xu B, Cao Y, Wei X, Wang Y, Han W, Wang H (2022) Depletion of BATF in CAR-T cells enhances antitumor activity by inducing resistance against exhaustion and formation of central memory cells. *Cancer Cell* 40:1407-1422.e7
83. Zhou W, Yan Y, Guo Q, Ji H, Wang H, Xu T, Makabel B, Pilarsky C, He G, Yu X, Zhang J (2021) Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing. *J Nanobiotechnology* 19:312
84. (1993) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 178:537–547
85. PBS-Puffer. URL: <https://www.chemie.de/lexikon/PBS-Puffer.html>
86. Isolation of mononuclear cells Methodology and applications. URL: https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17889011/contents/17544602_hand-book.pdf
87. InCelligence – Zellzählung Anleitung. URL: <https://incelligence.de/zellkultur/zellzaehlung/zellzaehlung-anleitung>
88. RPMI 1640 Medien. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-media-and-buffers/classical-media-and-buffers/rpmi-1640-media#what-is-rpmi-used>
89. Ionomycin Calciumsalz Ready Made Solution, from *Streptomyces conglobatus*, 1 mM in DMSO | Sigma-Aldrich. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/>
90. Bovine Serum Albumin - DE. URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/bovine-serum-albumin.html>

8. Publikation

Zentrale Ergebnisse der Dissertation werden im Rahmen einer noch nicht veröffentlichten Publikation enthalten sein.

9. Danksagung

Bei der Entstehung dieser Arbeit wurde ich von vielen Personen auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt, wofür ich mich nun am Ende dieser Reise bedanken möchte.

Zuallererst möchte ich mich bei dem Leiter des Instituts für Humangenetik und meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese für die Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit, in die Welt der Forschung schnuppern zu dürfen, bedanken.

Die größte Unterstützung war mir sicher meine Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Caroline Diener, welche mich von Anfang bis Ende bei allen Fragen und Problemen begleitet hat. Von der allerersten Einführung in den Laboralltag, über das Unterstützen bei Versuchen bis hin zu deinen Tipps bezüglich des Schreibens wissenschaftlicher Arbeiten hast du mir bei allen wichtigen Schritten zur Seite gestanden. Ich bedanke mich außerdem über deinen Einsatz zur Erstellung der Sequenzierungsbanken und der Antikörper-Färbungen, welche mir von dir abgenommen wurden.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die den ein oder anderen Beitrag bei der Durchführung von Laborarbeiten oder der Auswertung geleistet haben. Ein Danke geht an alle Mitarbeitenden des Instituts der Humangenetik für die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für die Einweisung zur methodischen Vorgehensweise der Arbeitsschritte in den Unterpunkten 4.1, 4.2 und 4.3 bei Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim und Frau Tanja Tänzer aus der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie. Ebenfalls bei Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim bedanken möchte ich mich für die Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchung und der Auswertung der resultierenden Daten. Bei Frau Tanja Tänzer möchte ich mich des Weiteren für Ihre Mithilfe bei der Antikörper-Färbung bedanken. Für die Prozessierung der Sequenzierungsdaten und die bioinformatische Analyse der Ergebnisse möchte ich mich bei Frau Friederike Grandke (Arbeitsgruppe: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Keller) bedanken, welche mir auch bei allen weiteren Fragen über die Ergebnisse zur Verfügung stand.

Zuletzt möchte ich bei all den Menschen bedanken, die zwar nicht direkt bei der Gestaltung der Arbeit beteiligt waren, mich aber auf dem ganzen Weg begleitet und emotional unterstützt haben. Allen voran waren meine Eltern und Brüder diejenigen, die mich von Anfang ermutigt haben und mich auch das ein oder andere Mal motiviert haben, weiter durchzuziehen. Auch meiner Mitbewohnerin möchte ich ein riesiges Danke aussprechen, da sie bei allen Hoch- und Tiefpunkten an meiner Seite war. An alle weiteren Freunde, welche von Anfang an bei dieser Reise mir als Begleitung gedient haben: ein riesengroßes Danke!

10. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.