

Aus der Augenklinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung regulatorischer B-Zellen und deren Zytokine im peripheren Blut von  
Glaukompatienten

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Felicitas Holley  
aus München

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

21. September 2023

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
2 Literaturdiskussion .....	2
2.1 Das Auge.....	2
2.1.1 Anatomie .....	2
2.1.2 Aufbau und Funktion der Retina .....	3
2.1.3 Immunprivileg des Auges.....	5
2.2 Glaukom .....	6
2.2.1 Definition .....	6
2.2.2 Pathophysiologie und Risikofaktoren .....	6
2.2.3 Therapie .....	7
2.3 Immunsystem.....	7
2.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems .....	8
2.3.2 Humorales Immunsystem .....	8
2.3.3 Zellen des adaptiven Immunsystems .....	10
2.3.4 Immunsystem und Glaukom.....	13
3 Material und Methoden .....	20
3.1 Material .....	20
3.1.1 Verwendete Materialien, Chemikalien und Geräte .....	20
3.1.2 Software .....	23
3.1.3 Puffer und Medium .....	24
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Patienten und Probanden .....	24
3.2.2 Blutabnahme.....	26
3.2.3 Gewinnung von Serumproben.....	26
3.2.4 Isolation Mononukleärer Zellen .....	26
3.2.5 Zellzahl-Bestimmung.....	27
3.2.6 Durchflusszytometrische Messung .....	29
3.2.7 In-Vitro-Stimulation von B-Zell-Subpopulationen .....	40
3.2.8 Microarray .....	43
3.2.9 Statistik .....	47
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Durchflusszytometrie.....	49

4.1.1	Lymphozyten.....	49
4.1.2	B-Zellen.....	51
4.1.3	Verhältnis der B-Zell-Untergruppen zueinander.....	60
4.2	Microarray.....	62
4.2.1	Serumproben.....	62
4.2.2	Überstände.....	65
5	Diskussion.....	68
5.1	Bedeutung der veränderten B-Zellzahlen.....	68
5.1.1	Regulatorische B-Zellen.....	68
5.1.2	Rolle der B-Zellen in autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen.....	71
5.2	Bedeutung der veränderten Lymphozytenzahlen.....	78
5.3	Bedeutung der veränderten Zytokinlevel.....	79
5.3.1	Veränderungen von IL-8 und VEGF-A.....	79
5.3.2	Veränderungen von IL-4.....	80
5.4	Limitationen der Arbeit und Ausblick.....	81
6	Zusammenfassung.....	83
7	Literaturverzeichnis.....	85
8	Danksagung.....	94
9	Tabellarischer Lebenslauf.....	95

# Abkürzungsverzeichnis

+	Positiv
-	Negativ
$\alpha$ -MSH	Alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon
Ab	Antikörper (Antibody)
ACAID	Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort
APRIL	Mitglied 13 der TNF Liganden Superfamilie
AQP4	Aquaporin-4
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BM	Bruchmembran
B <sub>mem</sub>	B-Gedächtniszelle (Memory B-Cell)
B <sub>reg</sub>	Regulatorische B-Zelle
C1QBP	Component 1 Q Subcomponent-binding Protein
CD	Cluster of differentiation bzw. cluster determinant
CD4 <sup>+</sup>	CD4 positive T-Helferzelle
CD8 <sup>+</sup>	CD8 positive zytotoxische T-Zelle
CD19	Oberflächenmerkmal von B-Zellen (Unterscheidung B-Zelle/Nicht-B-Zelle)
CD24	Oberflächenmerkmal von B-Zellen
CD27	Oberflächenmerkmal von B-Gedächtniszellen
CD38	Oberflächenmerkmal von B-Zellen
CD40L	Cluster of Differentiation 40 Ligand
CpG	Toll-like-Rezeptor-9-Ligand
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8 (entspricht IL-8)
EtOH	Alkohol
FasL	Fas Ligand
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter)
GCL	Ganglienzellschicht
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)
Hi	High
Hsp60	Hitzeschockprotein 60
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
HMGB1	High-mobility group box 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILCs	Innate lymphoide Zellen

INL	Innere nukleäre Schicht
Int	Intermediate
IPL	Innere plexiforme Schicht
IS	Innensegmente der Fotorezeptoren
ITP	Immunthrombozytopenie
IVIG	intravenös verabreichte Immunglobuline
<i>M</i>	Mittelwert
MAC	Membranangreifender Komplex
MBP	Myelin-Basisches Protein
MCODE	Molecular Complex Detection
MD	Mean Defect
MHC	Major histocompatibility complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
nFI	Normalisierte Fluoreszenz-Intensitäten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio
NMOSD	Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung
ONL	Äußere nukleäre Schicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
OS	Außensegmente der Fotorezeptoren
<i>p</i>	p-Wert
PACG	primäres Winkelblockglaukom
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
PDGFR- $\beta$	Platelet-derived growth factor receptor $\beta$
PE	Phycoerythrin
PE/Cy5	Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin-5.18
PLR	Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio
PLA <sub>2</sub> G5	Phospholipase A <sub>2</sub> G5
PNMA2	Paraneoplastisches Antigen Ma2
POAG	Primäres Offenwinkelglaukom
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RGC	Retinale Ganglienzellen
RPE	Retinales Pigmentepithel
<i>SD</i>	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sidescatter)
<i>t</i>	T-Wert
TARS	Threonin-tRNA Ligase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TLR9	Toll-like-Rezeptor-9
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha

T-PER	Tissue Protein Extraction Reagent
T <sub>regs</sub>	Regulatorischen T-Zellen
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
ZNS	Zentrales Nervensystems



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl, Geschlecht und Alter der Studienteilnehmer.....	25
Tabelle 2: Schema Oberflächenmarkierung.....	32
Tabelle 3: Übersicht über die für das Spotten verwendeten Antikörper.....	43
Tabelle 4: Verteilung der peripheren mononukleären Zellen.....	49
Tabelle 5: Anteil der Lymphozyten an PBMCs.....	50
Tabelle 6: Anteil der B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> ) an allen Lymphozyten.....	51
Tabelle 7: Anteil der regulatorischen B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> ) an allen B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> ).....	52
Tabelle 8: Anteile von B-Gedächtniszellen (CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> ) an allen B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> ).....	55
Tabelle 9: Anteile von reifen B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>int</sup> CD38 <sup>int</sup> ) an allen B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> ).....	59
Tabelle 10: <i>t</i> -Test und deskriptive Statistik der Microarray-Messergebnisse der Serumproben.....	63
Tabelle 11: Übersicht der Überstand-Poolproben.....	66
Tabelle 12: Fold Change Überstand-Poolproben – Patienten im Verhältnis zu Kontrollen.....	66

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Auges .....	2
Abbildung 2: Aufbau der Retina .....	4
Abbildung 3: Heat Map der Antikörperprofile .....	14
Abbildung 4: Einfluss der Antikörper gegen $\gamma$ -Synuklein und GFAP auf die Anzahl retinaler Ganglienzellen .....	16
Abbildung 5: Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk glaukomassoziierter Autoantigene .....	17
Abbildung 6: Workflow über die Teilschritte dieser Arbeit .....	19
Abbildung 7: Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation .....	27
Abbildung 8: Neubauer-Zählkammer .....	28
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers .....	29
Abbildung 10: Absorptions- und Emissionsspektren von FITC, PE, PE/Cy5 .....	31
Abbildung 11: FSC/SSC-Dot-Plot mit Lymphozyten-Gate .....	33
Abbildung 12: Ungefärbte Proben .....	34
Abbildung 13: Einstellungen der Spannung und Verstärkung der verschiedenen Detektoren .....	34
Abbildung 14: Kompensation einfach gefärbter Proben .....	35
Abbildung 15: FSC/FL1-Dot-Plot mit Gate um CD19 <sup>+</sup> Population .....	36
Abbildung 16: FL3/FL2-Dot-Plot mit dreifachgefärbten CD19 <sup>+</sup> Zellen .....	37
Abbildung 17: Kontur- und Dichteplot der dreifachgefärbten CD19 <sup>+</sup> Zellen .....	38
Abbildung 18: FL3/FL2-Dot-Plot mit Gates und zugehöriger Gate-Statistik zur Darstellung der B-Zell-Untergruppen .....	39
Abbildung 19: Anteil der Lymphozyten an allen PBMCs .....	50
Abbildung 20: Anteil CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> B <sub>regs</sub> an CD19 <sup>+</sup> B-Zellen .....	52
Abbildung 21: Änderung der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> B <sub>regs</sub> durch Stimulation mit CpG/CD40L .....	53
Abbildung 22: Änderung der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> B <sub>regs</sub> durch Stimulation mit Retinahomogenisat .....	54
Abbildung 23: Anteil CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> B <sub>mems</sub> an CD19 <sup>+</sup> B-Zellen .....	55
Abbildung 24: Änderung der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> B <sub>mems</sub> durch Stimulation mit CpG/CD40L .....	56
Abbildung 25: Änderung der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> B <sub>mems</sub> durch Stimulation mit Retinahomogenisat .....	57
Abbildung 26: Veränderung des Anteils der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> B <sub>mems</sub> an allen CD19 <sup>+</sup> B-Zellen durch die Stimulation mit Retinahomogenisat .....	57
Abbildung 27: Anteil CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>int</sup> CD38 <sup>int</sup> reife B-Zellen an CD19 <sup>+</sup> B-Zellen .....	58
Abbildung 28: Änderung der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>int</sup> CD38 <sup>int</sup> reifen B-Zellen durch Stimulation	59
Abbildung 29: Verhältnis von CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> B <sub>regs</sub> zu CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> B <sub>mems</sub>	60
Abbildung 30: Verhältnis von CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>int</sup> CD38 <sup>int</sup> reifen B-Zellen zu CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>-</sup> B <sub>mems</sub> .....	61
Abbildung 31: Microarray - normalisierte Fluoreszenz-Intensitäten von IL-8 .....	64
Abbildung 32: Microarray - normalisierte Fluoreszenz-Intensitäten von VEGF-A .....	65

# 1 Einleitung

Das Glaukom stellt sowohl in Europa als auch weltweit die zweithäufigste Ursache dar, weshalb Menschen erblinden (1). Im Jahr 2010 waren weltweit ungefähr 60,5 Millionen Menschen von einem primären Offenwinkel- oder Winkelblockglaukom betroffen. Insbesondere aufgrund der älter werdenden Bevölkerung wird geschätzt, dass diese Zahl im Jahr 2040 auf 111,8 Millionen Menschen ansteigen wird (2). Das Glaukom umfasst eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Auges, die mit einer typischen und potenziell progredienten Schädigung des Sehnervs einhergehen. Diese Schädigung führt zu korrespondierenden Gesichtsfelddefekten und kann letztlich in der Erblindung des Auges enden (3, S. 344 ff.). In dieser Studie wird das primäre Offenwinkelglaukom behandelt (POAG). Die einzige therapeutische Option zur Behandlung des POAGs ist derzeit die Senkung des Augeninnendrucks (1). Da der Glaukomschaden allerdings trotz eines gut eingestellten Augeninnendrucks fortschreiten kann, besteht neben der Augeninnendrucksenkung ein großer Bedarf an weiteren effektiven Behandlungsmöglichkeiten (4). Zur Entwicklung neuer Therapieoptionen müssen die Hintergründe der Pathogenese der Sehnervenschädigung besser verstanden werden. Nach dem aktuellen Stand der Forschung spielt das Immunsystem eine Rolle für die im Rahmen des Glaukoms auftretenden Neurodegeneration und den Verlust der retinalen Ganglienzellen (RGC) (5). Nach wie vor besteht allerdings ein großer Bedarf an weiteren Studien, die das Immunsystem im Hinblick auf das Verständnis der Pathogenese sowie auf neue Therapieoptionen des Glaukoms näher beleuchten. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung regulatorischer B-Zellen und deren Zytokine im peripheren Blut von Glaukompatienten. Dabei wurde zunächst die Anzahl der regulatorischen B-Zellen im Blut von Patienten mithilfe einer durchflusszytometrischen Messung bestimmt und diese mit der Anzahl bei einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Um die B-Zellen auf eine möglicherweise veränderte Fähigkeit zur Proliferation und eine erhöhte Reaktivität auf retinale Antigene hin zu untersuchen, wurden diese in vitro mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Die Zellzahlen wurden nach der Stimulation abermals mittels Durchflusszytometrie bestimmt und zwischen Erkrankten und Gesunden verglichen. Ein weiterer Teil der Arbeit war es, die Level verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine der Patienten und Probanden zu erheben und auf eventuelle Unterschiede hin zu untersuchen. Dies wurde mithilfe eines Antikörper-Microarrays durchgeführt, wobei sowohl Serumproben als auch Proben aus den verschiedenen Zellkulturüberständen in die Untersuchung eingeschlossen wurden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Auge

Das Auge ist ein zentrales Sinnesorgan des menschlichen Körpers, das der Aufnahme und Weiterleitung von Lichtreizen dient (5, S. 774). Durch das visuelle System wird ein großer Teil der Informationen über die Außenwelt an das Gehirn vermittelt. Auch im Gehirn selbst spiegelt sich die Relevanz des Sehens wider. Dort ist mehr als die Hälfte der grauen Substanz an der Verarbeitung visueller Sinneseindrücke beteiligt oder steht anderweitig mit dem Sehzentrum in Verbindung (6, S. V).

#### 2.1.1 Anatomie

Anatomisch gesehen lässt sich das Auge in einen vorderen und einen hinteren Augenabschnitt einteilen. Der vordere Abschnitt besteht aus der Hornhaut (Cornea), der Bindehaut (Conjunctiva), der Lederhaut (Sclera), der Iris mit Pupille und der Linse, welche über die Zonulafasern mit dem Ziliarkörper verbunden ist (7, S. 156 ff.). Eine Übersicht über die Strukturen des vorderen und hinteren Augenabschnitts sind in Abbildung 1 dargestellt.

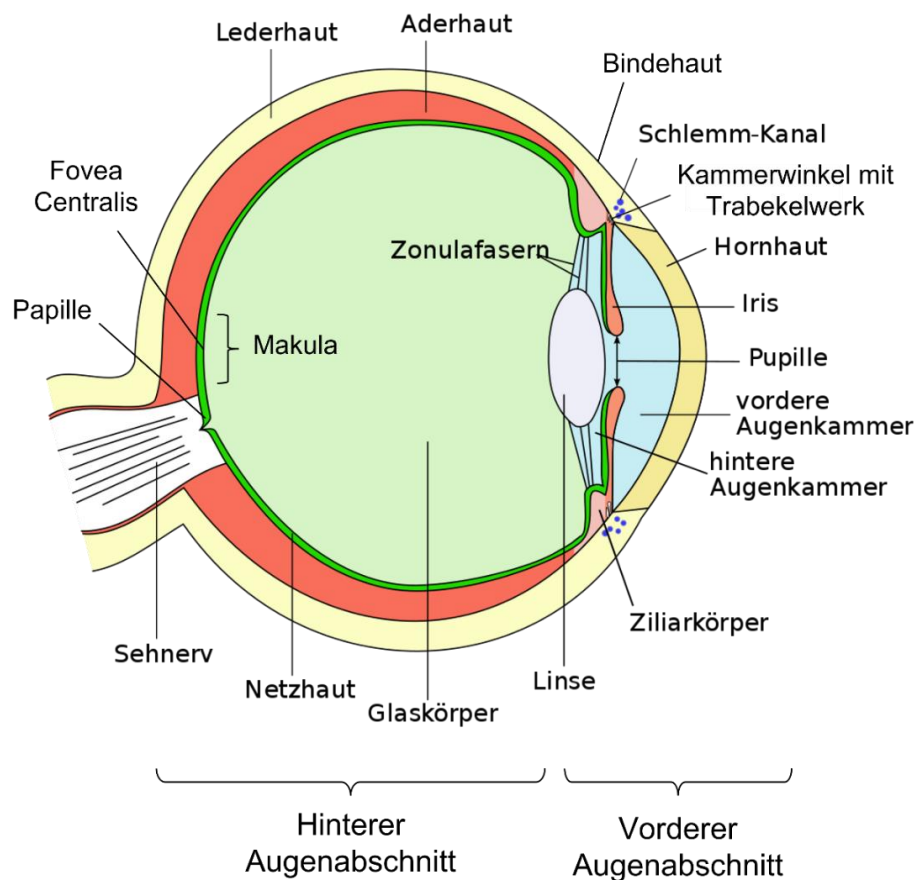


Abbildung 1: Anatomie des Auges

Quelle: In Anlehnung an (8)

Zwischen Cornea und Iris befindet sich die vordere Augenkammer, zwischen Iris und Zonulafasern die hintere Augenkammer. Der Übergang von Iris zu Cornea bildet dabei den Kammerwinkel, an den sich das Trabekelwerk und der Schlemm-Kanal anschließen. Der Ziliarkörper lässt sich in einen ebenen Teil (Pars Plana) und einen faltig aufgeworfenen Teil (Pars Plicata) einteilen (7, S. 156 ff.). Die Pars Plicata enthält den für die Akkommodation verantwortlichen Ziliarmuskel sowie die kammerwasserproduzierenden Ziliarfortsätze (6, S. 243). Das Kammerwasser dient der Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks sowie der Ernährung von Hornhaut und Linse (6, S. 11). Es wird durch Ultrafiltration und aktive Sekretion von den Epithelzellen des Ziliarkörpers gebildet und in die hintere Augenkammer sezerniert. Von dort gelangt es durch die Pupille in die vordere Augenkammer und fließt zum größten Teil durch das Trabekelwerk in den Schlemm-Kanal und die episkleralen Venen ab (3, S. 301 f.). Während des Abflusses folgt das Kammerwasser dem Druckgradienten in Richtung Kammerwinkel. Dabei muss es die physiologischen Widerstände an der Pupille (Pupillarwiderstand) und am Trabekelwerk überwinden. Dieser entsteht durch die engen Spalträume des Trabekelwerkes und wird als Trabekelwiderstand bezeichnet (7, S. 161).

Der hintere Augenabschnitt setzt sich, wie in Abbildung 1 dargestellt, aus dem Glaskörper (Corpus Vitreum), der Lederhaut (Sklera), der Aderhaut (Choroidea) und der Netzhaut (Retina) zusammen (7, S. 157 ff.). An der Papille (Papilla Nervi Optici) tritt der Sehnerv (Nervus Opticus) aus dem Inneren des Augapfels aus und bildet den blinden Fleck. Temporal davon, im Zentrum der Retina, befindet sich die Makula (Macula lutea) und in dessen Mitte die Fovea Centralis, die den Ort des schärfsten Sehens darstellt (6, S. 12).

### **2.1.2 Aufbau und Funktion der Retina**

Die Netzhaut ist entwicklungsgeschichtlich ein vorgeschobener Gehirnteil und dient der Aufnahme und Weiterverarbeitung von Lichtreizen. Man unterscheidet (von der Aufnahme des Lichtreizes aus beginnend) die Außen- und Innensegmente der Fotorezeptoren (OS und IS), die äußere nukleäre Schicht (ONL, entspricht den Zellkernen der Fotorezeptoren), die äußere plexiforme Schicht (OPL), die innere nukleäre Schicht (INL, enthält Bipolarzellen, Horizontalzellen, Müller-Zellen und amakrine Zellen), die innere plexiforme Schicht (IPL), die Ganglienzellschicht (GCL, entspricht den Zellkernen der Ganglienzellen) sowie die Axone der Ganglienzellen. Die Außensegmente der Fotorezeptoren grenzen nach außen an das retinale Pigmentepithel (RPE) und die Bruchmembran (BM). Das einfallende Licht durchdringt die gesamte Netzhaut, bevor es die Fotorezeptoren erreicht (6, S. 283 ff.). Eine Übersicht über die Schichten und Zellen der Netzhaut ist in Abbildung 2 dargestellt.

Das einfallende Licht wird von den Fotorezeptoren (1. Neuron) detektiert. Die Bipolarzellen (2. Neuron) empfangen das Signal der Fotorezeptoren und leiten es an die Ganglienzellen (3. Neuron) weiter. Horizontalzellen und amakrine Zellen bewirken dabei zusätzlich eine horizontale Signalweitergabe und -modulation. Die Müller-Zellen

sind spezielle Gliazellen und durchspannen senkrecht alle Schichten der Netzhaut. Sie dienen der Verankerung und sind wesentlich an der Ionenverteilung während des Erregungsprozesses der Netzhaut beteiligt. Die Ganglienzellen dienen der Übermittlung der Sehinformation an die Sehzentren des Gehirns. Die Fortsätze (Axone) der Ganglienzellen bilden den Sehnerv und treten an der Papille durch die Siebplatte (Lamina Cribrosa) der Sklera aus dem Auge aus. Außerhalb des Auges erhält der Sehnerv eine Myelinscheide und zieht von dort in Richtung Gehirn (6, S. 15 ff.; 283 ff.).

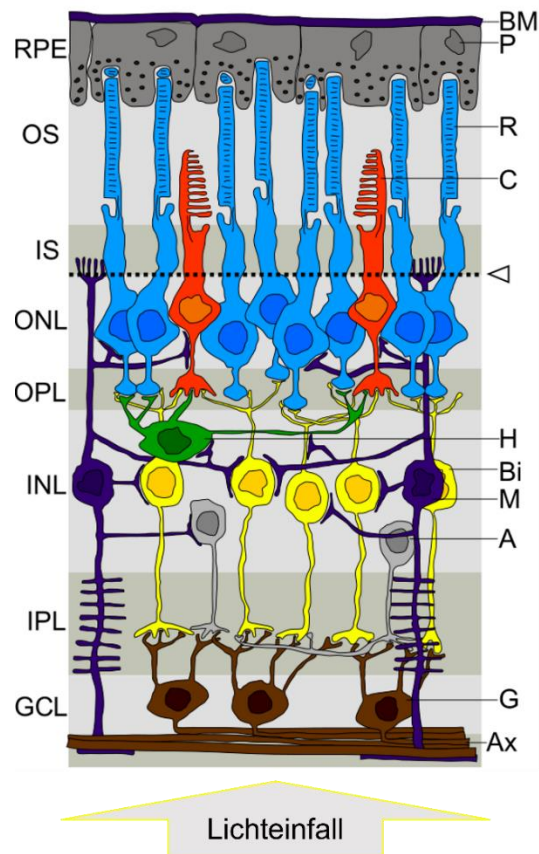


Abbildung 2: Aufbau der Retina

Legende:

RPE	Retinales Pigmentepithel	BM	Bruch-Membran
OS	Außensegmente der Fotorezeptorzellen	P	Pigmentepithelzelle
IS	Innensegmente der Fotorezeptorzellen	R	Stäbchen
ONL	äußere nukleäre Schicht	C	Zapfen
OPL	äußere plexiforme Schicht	△	Membrana limitans externa
INL	innere nukleäre Schicht	H	Horizontalzelle
IPL	innere plexiforme Schicht	Bi	Bipolarzelle
GCL	Ganglienzellschicht	M	Müller-Zelle
		A	amakrine Zelle
		G	Ganglienzelle
		Ax	Axone

Quelle: In Anlehnung an (9)

### 2.1.3 Immunprivileg des Auges

In der Vorderkammer, im subretinalen Raum sowie im Glaskörper besteht eine Immuntoleranz (6, S. 10 f.). Es wird vermutet, dass diese dazu dient, solche Gewebe zu schützen, die eine begrenzte Kapazität zur Regeneration haben. Organe mit dieser besonderen Eigenschaft sind unter anderem das Gehirn sowie das Auge. In diesen Geweben soll eine unkontrollierte entzündliche Immunreaktion unterdrückt werden, um sie vor potenziell schädlichen Folgen, wie etwa dem Verlust des Sehvermögens, zu bewahren (10). Nach dem heutigen Verständnis ist das Immunprivileg des Auges ein komplexes System aus physikalischen Barrieren, einem immunsupprimierenden Milieu des Auges sowie einer aktiven Regulation der systemischen Immunantwort (11, 12). Unter den physikalischen Barrieren versteht man die Blut-Retina- sowie die Blut-Kammerwasser-Schranke (13). Diese ermöglichen eine Trennung der intraokulären Kompartimente von der Blut- und Lymphzirkulation und bewahren das Augeninnere vor ungehindertem Ein- und Austritt von Zellen und großen Molekülen (12, 13). Das hemmende Milieu des Auges, welches aus zellgebundenen und löslichen immunsuppressiven Faktoren besteht, inhibiert die Aktivität von immunkompetenten Zellen (12). Im Kammerwasser konnten die löslichen supprimierenden Faktoren Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) (12, 14), Fas Ligand (FasL) (15) sowie alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) (16) nachgewiesen werden. Diese Faktoren können die Umwandlung von T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen induzieren (11). Als Beispiel für die aktive Regulation der systemischen Immunantwort ist die sogenannte Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort (ACAID) zu nennen. Wird ein fremdes Antigen in die Vorderkammer eingebracht, so löst dies eine von der Norm abweichende systemische Immunreaktion aus. An dieser sind T- und B-Zellen beteiligt, welche ohne eine Entzündungsreaktion Pathogene und Virulenzfaktoren eliminieren. Außerdem kommt es zur Aktivierung von regulatorischen T-Zellen, die eine entzündliche Immunreaktion inhibieren (17).

Trotz des Immunprivilegs des Auges gibt es okuläre autoimmun bedingte Erkrankungen wie die autoimmune Uveitis (18). Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte autoreaktive T-Zellen in der Lage sind, die Blut-Retina-Schranke zu passieren (19, 20). Außerdem konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass im Gegensatz zu naiven T-Zellen aktivierte Effektor-T-Zellen nicht von dem immunsupprimierenden Milieu des Auges inhibiert werden können (21). Das Immunprivileg des Auges schützt dieses also vor den Folgen von tagtäglich vorkommenden kleineren Verletzungen und den dadurch eindringenden Pathogenen, aber es kann das Auge nicht vor autoimmunem Angriffen bewahren (21). Möglicherweise kann das Immunprivileg des Auges sogar für autoimmune Vorgänge im Auge prädisponieren. Da das Auge hinter der Blut-Retina-Schranke abgeschottet ist, könnte das Erreichen der peripheren Toleranz behindert werden. Die Zellen des adaptiven Immunsystems würden also nicht lernen, retinale Antigene als körpereigen zu erkennen (18). Dadurch könnten für retinale Antigene spezifische autoreaktive T-Zellen entstehen, die, einmal aktiviert, nicht mehr von dem immunsupprimierenden Milieu des Auges inhibiert werden können (18, 21).

## **2.2 Glaukom**

### **2.2.1 Definition**

Das in dieser Studie behandelte primäre Offenwinkelglaukom ist von sekundären, kongenitalen und Winkelblock-Glaukomen abzugrenzen (6, S. 410 ff.). Beim POAG handelt es sich nach der Leitlinie der „European Glaucoma Society“ um eine chronisch progressive Optikusneuropathie mit charakteristischen morphologischen Veränderungen des Sehnervenkopfes und der retinalen Nervenfaserschicht. Diese Veränderungen sind mit einem progressiven Verlust von retinalen Ganglienzellen sowie einem korrespondierenden Gesichtsfeldverlust assoziiert (1). Um diagnostisch das POAG von anderen Glaukomformen zu unterscheiden, ist das Fehlen von zugrunde liegenden Augenerkrankungen und angeborenen Anomalien sowie ein offener Kammerwinkel nachzuweisen (1).

### **2.2.2 Pathophysiologie und Risikofaktoren**

Die genaue Ätiologie des Glaukoms ist weiterhin unklar. Es wird vermutet, dass verschiedene genetische Faktoren sowie der Einfluss von Komorbiditäten eine wichtige Rolle spielen (1). Auch konnte eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des Glaukoms gezeigt werden (22). Auf die Rolle des Immunsystems wird in Punkt 2.3.4 (Immunsystem und Glaukom) näher eingegangen.

In der aktuellen Lehre wird angenommen, dass die Sehnervenschädigung als Folge einer Verformung der Lamina Cribrosa aufgrund eines individuell zu hohen Augeninnendrucks entsteht. Die Augeninnendruckerhöhung kommt durch eine Erhöhung des Abflusswiderstandes im Trabekelwerk und einen dadurch gestörten Kammerwasserfluss zustande (1). Durch die Verformung der Lamina Cribrosa wird postuliert, dass es im Bereich der Papille zu einer mechanischen Schädigung der retinalen Nervenfasern, welche auf ihrem Weg aus dem Auge zum Gehirn durch diese hindurchtreten, kommt. Dies hat eine axonale Schädigung zur Folge, wodurch insbesondere der retrograde axonale Transport vermindert wird, und endet letztlich in der Apoptose von retinalen Ganglienzellen (3, S. 301 ff.; 344 ff.). Dieser Vorgang führt unbehandelt zu einem progressiven Verlust von retinalen Ganglienzellen und einem damit verbundenen fortschreitenden Gesichtsfelddefekt, welcher schlussendlich in der Erblindung des Auges mündet (6, S. 410 ff.).

Es konnte, trotz nicht komplett verstandener Ätiologie, eine Vielzahl von Risikofaktoren, die für die Entwicklung eines Offenwinkelglaukoms prädisponieren, definiert werden (1). Als ersten Risikofaktor ist das Alter zu nennen. Das POAG tritt üblicherweise nach dem 50. Lebensjahr auf und die Prävalenz erhöht sich dramatisch mit dem Alter. Mit jedem Lebensjahr steigt das Risiko, ein Glaukom zu entwickeln, um ca. 5 % (1). Ein erhöhter intraokulärer Druck ist ebenfalls mit der Prävalenz und Inzidenz des Offenwinkelglaukoms assoziiert. Mit jedem Anstieg von 1 mmHg steigt das Risiko für ein Glaukom um ca. 10 - 18 %, je nach ethnischen Hintergrund (1). Außerdem ist der Augeninnendruck bis heute der einzige modifizierbare Risikofaktor und damit



therapeutisch der relevanteste (1, 23). Weitere Risikofaktoren sind eine positive Familienanamnese, niedriger okulärer Perfusionsdruck, systemische vaskuläre Erkrankungen (1), eine mitochondriale Dysregulierung (24), eine veränderte Funktion im endoplasmatischen Retikulum der Zellen (25) sowie ein damit korrespondierender oxidativer Stress (26).

### **2.2.3 Therapie**

Wie in Punkt 2.2.2 beschrieben, kann das Glaukom unbehandelt zur Erblindung führen. Die einzige therapeutische Option ist derzeit die Senkung des Augeninnendrucks (1). Dabei kommen sowohl eine medikamentöse Therapie als auch eine Laserbehandlung oder Operation sowie eine Kombination der verschiedenen Therapieoptionen zur Anwendung (6, S. 428 ff.) Da sich allerdings das Glaukom trotz eines gut eingestellten Augeninnendrucks verschlechtern kann, besteht ein großer Bedarf an weiteren effektiven Behandlungsmöglichkeiten neben der Augeninnendrucksenkung (4). Im Rahmen der aktuellen Forschung werden viele Ansätze untersucht, um eine augeninnendruckunabhängige Therapie zu finden, welche weitere Neuroprotektion retinaler Ganglienzellen ermöglicht (4). Um diese zu finden, müssen die Hintergründe der Pathogenese des Zelluntergangs besser verstanden werden. In klinischen Studien konnten veränderte Immunreaktionen gegen Retina- und Sehnervenantigene im Serum sowie im Kammerwasser von Glaukompatienten aufgezeigt werden. Dies spricht für die Beteiligung des Immunsystems an der im Rahmen des Glaukoms auftretenden Neurodegeneration und am Verlust der retinalen Ganglienzellen (5). Dieser Aspekt wird im Detail in den folgenden Absätzen der Dissertation weiter erläutert und bietet eine potenziell sehr erfolgsversprechende Möglichkeit alternative Therapien für das Glaukom zu finden. Jedoch besteht nach wie vor ein großer Bedarf an weiteren Studien, die die Rolle des Immunsystems im Hinblick auf das Verständnis der Pathogenese sowie auf neue Therapieoptionen des Glaukoms näher beleuchten.

## **2.3 Immunsystem**

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem des Körpers und erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben. Es schützt den Organismus vor Krankheitserregern und körperfremden Stoffen, beseitigt körpereigene funktionslose, tote oder entartende Zellen und leistet Aufbauarbeiten nach überstandener Infektion (27, S. 2). Klassischerweise lässt sich das Immunsystem in angeborenes und adaptives Immunsystem unterteilen (28, S. 4). Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie des Organismus und löst eine unspezifische Immunantwort aus, bei der körperfremde Stoffe nach dem Prinzip der Mustererkennung ausfindig gemacht und bekämpft werden (28, S. 28 ff.). Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort, welche sofort nach Kontakt mit einem Pathogen ausgelöst wird, dauert die Reaktion des adaptiven Immunsystems mehrere Tage. Durch hoch spezialisierte Antigenrezeptoren, welche aufgrund von somatischer Rekombination eine enorme Bandbreite an Antigenen binden können, kann allerdings das adaptive Immunsystem Krankheitserreger deutlich wirksamer und spezifischer

bekämpfen (29, S. 9). Der Erfolg des Immunsystems beruht aber letztlich auf dem Zusammenspiel zellulärer und humoraler Faktoren der angeborenen und adaptiven Immunantwort (27, S. 2).

### **2.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems**

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, welche gewebsständig sind, und deren Vorläufer, die Monozyten, welche im Blut zirkulieren (29, S. 9 f.). Die Aufgabe der Makrophagen ist das Erkennen und die Phagozytose von eingedrungenen Pathogenen sowie das Sezernieren von Zytokinen, welche die Immunreaktion in Gang setzen. Bei einer Immunreaktion werden eine große Anzahl an Neutrophilen Granulozyten produziert, welche ebenfalls Erreger phagozytieren und diese zusätzlich durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen oder anderen toxischen Substanzen lysieren (28, S. 4 f.). Weitere Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Mastzellen, die dendritischen Zellen, die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Innaten lymphoiden Zellen (ILCs). Deren Aufgaben sind zusammengefasst die Phagozytose, die Freisetzung toxischer Substanzen zur Bekämpfung von Erregern, die Antigenpräsentation und Sekretion von Entzündungsmediatoren zum Auslösen einer Entzündungsreaktion sowie zur Aktivierung weiterer Immunzellen (29, S. 9-16).

### **2.3.2 Humorales Immunsystem**

Das humorale Immunsystem fasst, im Gegensatz zu den zellulären Bestandteilen, alle im Plasma enthaltenen Proteine des Immunsystems zusammen. Da das humorale Immunsystem sowohl Teile der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort beinhaltet, werden diese hier gemeinsam behandelt. Zum humoralen Immunsystem gehören das Komplementsystem, die Antikörper sowie die Zytokine (29, S. 34; 48). Da das Komplementsystem für diese Studie nicht relevant ist, werden hier lediglich die Antikörper sowie die Zytokine besprochen.

#### **2.3.2.1 Antikörper**

Bei Antikörpern beziehungsweise Immunglobulinen handelt es sich um Y-förmige Proteine. Mit den beiden Armen der Y-Struktur können die Antikörper mit hoher Spezifität verschiedene Antigene erkennen und binden. Neben der spezifischen Antigenbindung lösen Antikörper auch immunologische Effektormechanismen aus. Zunächst kommen sie als Transmembranrezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten vor. Dort werden sie als B-Zell-Rezeptor (BCR) bezeichnet. Bei einer Immunreaktion differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen und sezernieren in großer Zahl lösliche Antikörper. Antikörper können in fünf verschiedene Immunglobulinklassen unterteilt werden, welche sich in ihrer Struktur, ihren Funktionen und ihrem Vorkommen im Körper unterscheiden. Diese sind IgM, IgD, IgG, IgA und IgE wobei das „Ig“ jeweils für Immunglobulin steht. IgM wird von allen naiven B-Zellen auf der Oberfläche exprimiert und ist damit der erste Antikörper, der bei einer Immunreaktion sezerniert wird. Durch Klassenwechsel werden im Verlauf der Immunreaktion vermehrt die

anderen Antikörperklassen gebildet, wobei IgD mengenmäßig den größten Anteil der im Serum nachweisbaren Antikörper ausmacht (28, S. 9-15).

### 2.3.2.2 Zytokine

Unter Zytokinen werden eine Reihe von Proteinen zusammengefasst, die von Zellen gebildet werden und das Verhalten von anderen Zellen, insbesondere das von Immunzellen, beeinflussen. Die von Lymphozyten gebildeten Zytokine werden auch Interleukine genannt und mit IL abgekürzt. Daneben gibt es auch Chemokine, welche für das Anlocken und die Aktivierung von Phagozyten und Lymphozyten von zentraler Bedeutung sind (29, S. 132 ff.). Im Folgenden werden ausgewählte pro- und antiinflammatorischen Zytokine kurz vorgestellt.

- TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha) ist ein proinflammatorisches Interleukin, welches von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen ausgeschüttet wird (29, S. 1075).
- Interferon- $\gamma$  ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der Familie der Interferone. Es wird vor allem von T<sub>H</sub>1-Zellen, CD8 positiven T-Zellen (siehe zur genaueren Darstellung dieser Zellarten Abschnitt 2.3.3) und NK-Zellen sezerniert und führt zur Makrophagenaktivierung, zum Ig-Klassenwechsel sowie zur T<sub>H</sub>1-Differenzierung (28, S. 316).
- IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zu Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen führt, zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen beiträgt und Fieber auslöst (29, S. 1071).
- IL-8 oder CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8) bezeichnet ein proinflammatorisches Chemokin, welches chemotaktisch für Neutrophile, Basophile, T-Zellen und B-Zellen wirkt (28, S. 314).
- HMGB1 (High-mobility group box 1) ist ein proinflammatorisches ubiquitär vorkommendes Protein, das bei Zelltod und von Zellen, die aktiviert, beschädigt oder Stress ausgesetzt wurden, freigesetzt wird (30).
- VEGF-A (Vascular endothelial growth factor) ist ein Signalmolekül, welches eine Erweiterung von Gefäßen sowie eine Erhöhung der Permeabilität bewirkt und an der Angiogenese beteiligt ist (28, S. 99 f.).
- IL-4 ist ein Zytokin, dem insbesondere eine antiinflammatorische, aber auch eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben wird (31). Es bewirkt eine B-Zell-Aktivierung, einen IgE-Klassenwechsel, eine T<sub>H</sub>1-Suppression und eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung (28, S. 314).
- Unter TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) werden drei Zytokine (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3) zusammengefasst, die sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Sie werden unter anderem von regulatorischen T-Zellen und regulatorischen B-Zellen gebildet (29, S. 1077, 32). TGF- $\beta$  kann die Umwandlung von naiven zu regulatorischen T-Zellen induzieren (33). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 im Trabekelmaschenwerk von POAG-Patienten

erhöht ist. TGF- $\beta$ 1 induziert Fibrose und kann so zu einem Umbau der extrazellulären Matrix und zum Anstieg des Augeninnendrucks führen (34). Auch das Level von TGF- $\beta$ 2 ist im Kammerwasser von Glaukumpatienten erhöht (35).

- IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das von regulatorischen B-Zellen, regulatorischen T-Zellen, dendritischen Zellen sowie Makrophagen ausgeschüttet wird. Es führt zu einer Suppression von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sowie zur Inhibition von bestimmten Funktionen der Makrophagen und dendritischen Zellen (28, S. 314). Weitere immunsuppressive Funktionen von IL-10 sind in den Abschnitten 2.3.3.2 sowie 5.1.1.2 dargestellt.
- IL-35 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches von regulatorischen T-Zellen und B-Zellen sezerniert wird (29, S. 1074). Es kann eine regulatorische Aktivität bei naiven T-Zellen induzieren und T-Zell-Proliferation inhibieren (36).

### 2.3.3 Zellen des adaptiven Immunsystems

#### 2.3.3.1 T-Zellen

T-Zellen gehören zu den Zellen des adaptiven Immunsystems. Bei T-Zellen können zwei Hauptgruppen unterschieden werden, diese wiederum können anhand des jeweiligen Oberflächenmerkmals der Zelle differenziert werden. Unter Oberflächenmerkmal versteht man ein bestimmtes Molekül auf der Oberfläche von Immunzellen, welches durch monoklonale Antikörper erkannt und gebunden werden kann. Ein Oberflächenmolekül, das von der Immunzelle exprimiert wird, wird als „cluster determinant“ bezeichnet. Die Antikörper, die daran binden können, werden als „cluster of differentiation“ zusammengefasst. Die verschiedenen Oberflächenmerkmale der Immunzellen (CD) wurden nach ihrer Entdeckung fortlaufend nummeriert, so dass heute anhand der CD-Nummer genau beschrieben werden kann, welches Molekül durch die Zelle exprimiert wird (28, S. 6). Bei den T-Zellen werden CD4 positive (CD4<sup>+</sup>) T-Helferzellen und CD8 positive (CD8<sup>+</sup>) zytotoxische T-Zellen unterschieden. Sie können mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors Antigene, welche ihnen von antigenpräsentierenden Zellen über ein MHC-Molekül (major histocompatibility complex) präsentiert werden, erkennen (27, S. 60; 67). Zu den Aufgaben der T-Zellen gehört die Optimierung der Immunantwort. Sie aktivieren B-Zellen zur Antikörperproduktion und unterstützen Makrophagen dabei, aufgenommene Pathogene abzutöten. Neben der Steigerung der Immunantwort haben sie auch eine immunregulierende Funktion. Eine Untergruppe der T-Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>) wirken antiinflammatorisch und supprimieren die Immunantwort (28, S. 6). Die T<sub>regs</sub> gehören zur Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Als Schlüsselfaktor für ihre immunsuppressive Wirkung konnte der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) identifiziert werden. Fehlt dieser, kommt es zu einer Dysregulation des Immunsystems (37). Zur Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gehören neben den antiinflammatorischen T<sub>regs</sub> auch die beiden proinflammatorisch wirkenden Subtypen der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren das Zytokin Interferon- $\gamma$  und wirken vor allem an der Aktivierung von

Makrophagen mit. Durch T<sub>H</sub>17-Zellen wird das Zytokin IL-17 sezerniert und sie wirken unterstützend auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd (29, S. 487; 1164 f.).

### 2.3.3.2 B-Zellen

B-Zellen gehören ebenfalls zu den Zellen der adaptiven Immunantwort. Sie können mithilfe ihrer membranständigen Antikörper, den B-Zell-Rezeptoren, eine Vielzahl an Antigenen erkennen (27, S. 70 ff.). Nach Aktivierung einer B-Zelle, welche T-Zell-unabhängig sowie T-Zell-abhängig stattfinden kann, differenziert diese zur Plasmazelle und produziert eine große Zahl von antigenspezifischen Antikörpern (29, S. 17). Bei der T-Zell-unabhängigen Aktivierung werden die B-Zellen durch das Erkennen bestimmter Antigene, welche aus repetitiven Epitopen aufgebaut sind, direkt aktiviert und differenzieren zu IgM-produzierenden Plasmazellen. Im Unterschied dazu kommt es bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung zum Klassenwechsel der gebildeten Antikörper sowie zur Ausbildung eines B-Zell-Gedächtnisses (27, S. 72). B-Zellen lassen sich je nach Entwicklungsstadium und Funktion in verschiedene Untergruppen unterteilen (29, S. 379 ff.). Die unterschiedlichen Subtypen können anhand des jeweiligen Profils von Oberflächenmerkmalen (CD) der Zellen charakterisiert werden. Die an den Oberflächenmerkmalen bindenden Antikörper kann man mit verschiedenen Methoden sichtbar machen und dadurch die genaue Beschaffenheit der untersuchten Zelle bestimmen (28, S. 6). In dieser Studie wurde dazu die Durchflusszytometrie verwendet. Allen B-Zellen, die im Blut vorkommen, ist gemeinsam, dass sie das Oberflächenmolekül CD19 ausprägen. Eine Ausnahme hiervon sind lediglich die Plasmazellen. Antikörper gegen CD19 können also genutzt werden, um eine Unterscheidung zwischen B-Zellen und Nicht-B-Zellen zu treffen (38).

#### Transitionale B-Zellen

Nachdem eine B-Zelle im Knochenmark entstanden ist und verschiedene Reifungsprozesse sowie die Selektion der zentralen Toleranz durchlaufen hat, verlässt sie das Knochenmark als transitionale B-Zelle. Dabei exprimiert sie auf ihrer Oberfläche große Mengen des Antigenrezeptors IgM und in geringem Maße auch IgD. IgM ist das erste Immunglobulin, das von B-Zellen exprimiert wird, während IgD in großen Mengen erst von reifen B-Zellen ausgeprägt wird (29, S. 395 ff.). Die transitionale B-Zelle ist durch weitere Oberflächenmerkmale gekennzeichnet. Sie exprimiert die Merkmale CD19, CD24 und CD38. Dabei werden die Merkmale CD24 und CD38 sehr stark ausgeprägt und als „high“ (hi) bezeichnet. Das Merkmal CD19 dagegen wird nur als „positiv“ (+) bezeichnet. Ein wichtiges Merkmal zur Unterscheidung von anderen B-Zellen, insbesondere B-Gedächtniszellen, ist CD27. Dieses wird von den transitionalen B-Zellen nicht exprimiert, somit sind sie für CD27 negativ (-). Ihr Oberflächenprofil ist damit IgD<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> (38). Diese Zellen unterlaufen eine weitere Prüfung der Toleranz, welche als periphere Toleranz bezeichnet wird. Dabei wird ein weiteres Mal getestet, ob die B-Zellen auf Autoantigene reagieren und nur solche, die das nicht tun, können sich zur nächsten Stufe der Reifung weiterentwickeln (29, S. 395 ff.).

### Reife B-Zellen

Die letzten Schritte der Entwicklung zur reifen B-Zelle finden in den B-Zell-Follikeln der Milz statt. Dort erhalten die B-Zellen die nötigen Signale zur Reifung und zum Überleben. Ein wichtiges Signal ist dabei die niedrigschwellige Aktivierung über den B-Zell-Rezeptor. Neben diesem Signal ist eine Stimulation des BAFF-Rezeptors, welcher durch die transitionalen B-Zellen exprimiert wird, essenziell (29, S. 396 ff.). Dieser wird durch den B-Zell aktivierenden Faktor BAFF (B cell activating factor of the TNF-family) stimuliert. BAFF ist ein Vertreter der TNF-Familie und wird von einigen Zellen, darunter Monozyten, Makrophagen, Knochenmarksstromazellen, T-Zellen und den in den B-Zell-Follikeln der Milz vorkommenden dendritischen Follikelzellen, exprimiert (29, S. 396 ff., 39). Die Zellen werden dadurch zur Produktion von IgD angeregt und entwickeln sich so zu langlebigen, reifen B-Zellen. Da sie noch keinen Antigenkontakt hatten, werden sie auch als naive B-Zellen bezeichnet (29, S. 396 ff.). Das Profil der Oberflächenmerkmale der reifen B-Zellen unterscheidet sich von dem der transitionalen B-Zellen. Die Expression von IgM verringert sich, stattdessen steigt die von IgD (29, S. 402, 38). Außerdem wird die Ausprägung der Oberflächenmerkmale CD24 und CD38 herunterreguliert, so dass diese jetzt als „intermediate“ (int) angegeben werden. Das Oberflächenprofil der reifen B-Zellen ist damit  $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD19}^+\text{CD27}^-\text{CD24}^{\text{int}}\text{CD38}^{\text{int}}$  (38, 40, 41).

### B-Gedächtniszellen

Nachdem eine naive Zelle Antikörperkontakt hatte, entwickelt sie sich entweder zu einer Plasmazelle oder zu einer B-Gedächtniszelle (Memory B-Cell,  $B_{\text{mem}}$ ) weiter. Während die Plasmazellen als Effektorzellen für die Antikörperproduktion und somit für die direkte Bekämpfung von Pathogenen zuständig sind, ist es Aufgabe der B-Gedächtniszellen, eine langanhaltende Immunität zu gewährleisten. Kommen B-Gedächtniszellen ein zweites Mal in Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen, können sie sofort zu Effektorzellen differenzieren und so zu einer schnellen und effektiven Immunantwort beitragen (29, S. 616 ff., 42). Ein weiterer Beitrag der B-Gedächtniszellen zur Immunreaktion ist die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie Lymphotoxin und TNF- $\alpha$ . Es konnte gezeigt werden, dass B-Gedächtniszellen, unter den B-Zellen, den größten Anteil dieser Zytokine sezernieren (43). Um die B-Gedächtniszellen von anderen B-Zellen abzugrenzen ist der wichtigste Marker CD27. Dieser ist im Gegensatz zu den transitionalen und den reifen B-Zellen positiv (38). IgD wird auf der Oberfläche der meisten B-Gedächtniszellen nicht mehr ausgeprägt, während IgM und IgG sowohl exprimiert als auch nicht exprimiert werden können (38). Diese Merkmale dienen deshalb nicht zur Abgrenzung der B-Gedächtniszellen gegenüber anderen B-Zellen, sondern dazu, verschiedene Subtypen der Gedächtniszellen zu differenzieren (38). Der Marker CD24 wird wie bei den transitionalen B-Zellen stark exprimiert, CD38 dagegen wenig bis gar nicht. B-Gedächtniszellen werden also anhand des Oberflächenprofils  $\text{CD19}^+\text{CD27}^+\text{CD24}^{\text{hi}}\text{CD38}^-$  charakterisiert (38, 40).

### Regulatorische B-Zellen

Während B-Zellen aufgrund der Antikörperproduktion allgemein für ihre proinflammatorische Funktion in der Immunantwort bekannt sind, gibt es auch eine kleine B-Zell-Untergruppe, die hemmend auf das Immunsystem wirkt (44). Hinweise auf diese sogenannten regulatorischen B-Zellen ( $B_{\text{regs}}$ ) wurden zuallererst im Maus-Modell beschrieben und deren Verständnis war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung. In diesem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die keine B-Zellen hatten, sich kaum von einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis erholen konnten (45). Wenige Jahre später konnte herausgefunden werden, dass das Fehlen von IL-10-produzierenden B-Zellen die Ursache für den Verlust der immunsuppressiven Funktion war (46). Auch wurde gezeigt, dass es mit dem Fehlen von IL-10-produzierenden  $B_{\text{regs}}$  zu einer Zunahme von  $T_{\text{H1}}$ - und  $T_{\text{H17}}$ -Zellen und zu einer Abnahme von FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) kommt (47). Beim Menschen konnten Zellen, die diese immunsupprimierenden Eigenschaften aufweisen, in der Gruppe der  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^{\text{hi}}$  transitionalen B-Zellen nachgewiesen werden (48). Neben diesen Zellen wurden auch andere B-Zell-Untergruppen identifiziert, die eine immunsuppressive Wirkung durch die Sekretion von IL-10 entfalten können (49). In dieser Studie wurde die Anzahl der regulatorischen B-Zellen anhand des Oberflächenprofils  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^{\text{hi}}$  bestimmt.

#### **2.3.4 Immunsystem und Glaukom**

Die Pathogenese des Glaukoms ist noch nicht vollständig verstanden, es konnte allerdings gezeigt werden, dass das Immunsystem eine Rolle spielt (22). Im Folgenden soll der aktuelle Stand der Forschung zur Beteiligung des Immunsystems kurz dargestellt werden.

Die Arbeitsgruppe der Experimentellen Ophthalmologie Mainz um Grus et al. sowie auch andere Arbeitsgruppen konnten veränderte Immunreaktionen gegen Retina- und Sehnervenantigene im Serum sowie im Kammerwasser von Glaukompatienten und Veränderungen der T-Lymphozyten und Makrophagen bei POAG-Patienten nachweisen (22). Sowohl im Serum als auch im Kammerwasser von an Glaukom erkrankten Personen konnten veränderte Konzentrationen von verschiedenen Autoantikörpern nachgewiesen werden. So sind beispielsweise die Konzentrationen beziehungsweise die Abundanz der Antikörper, die gegen Alpha-Fodrin (Spektrin) (50), Glutathion-S-Transferase (51), Myelin-Basisches Protein (MBP) (52) und Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) (53) gerichtet sind, erhöht. Die Abundanz der Antikörper gegen  $\alpha$ B-Crystallin und Vimentin hingegen ist bei Erkrankten erniedrigt (52, 53). Dabei zeigten sich nicht nur Unterschiede zwischen Glaukompatienten und Gesunden, sondern es konnte auch zwischen verschiedenen Glaukomformen diskriminiert werden (54). In Abbildung 3 sind beispielhaft die veränderten Antikörperreaktivitäten gegen Myelin-Basisches Protein und Vimentin im Serum von Personen, welche an einem Normaldruckglaukom oder Offenwinkelglaukom erkrankt sind und gesunden Vergleichspersonen dargestellt.

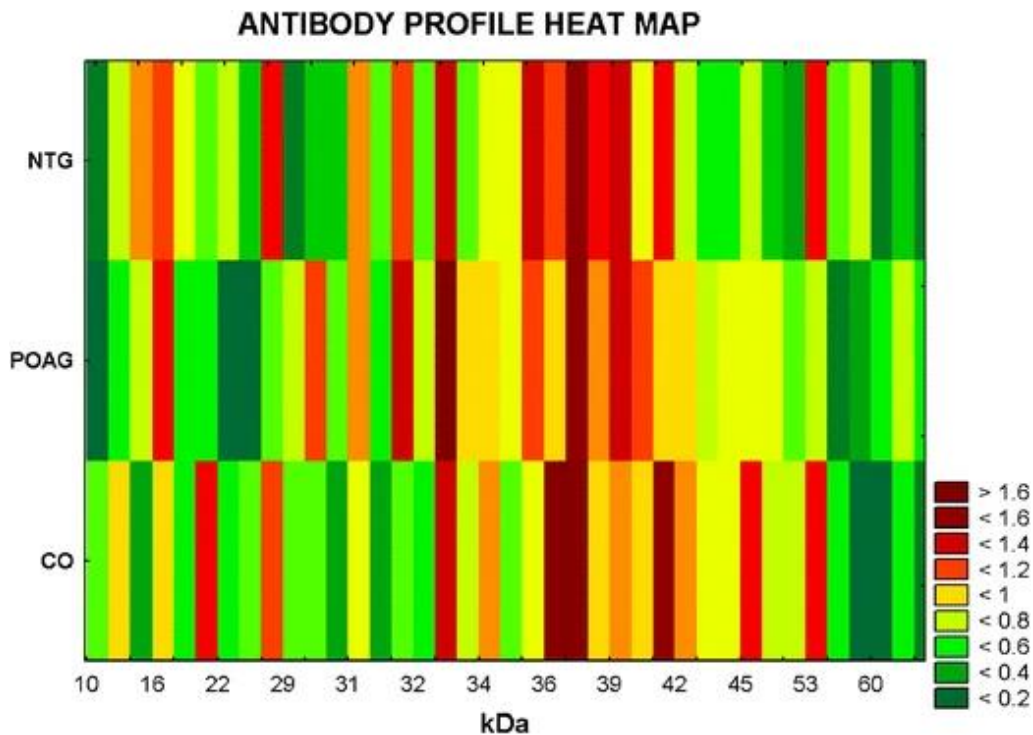


Abbildung 3: Heat Map der Antikörperprofile

Darstellung der komplexen Antikörperprofile gegen Sehnervenantigene im Serum von Glaukompatienten und Kontrollpersonen als Heat Map in Pseudofarben. Dabei sind die Antikörperreaktivitäten von Personen mit Normaldruckglaukom (NTG), mit primärem Offenwinkelglaukom (POAG) und gesunden Vergleichspersonen (CO) (Y-Achse) gegen das korrespondierende Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) (X-Achse) aufgetragen. Das Antigenband bei circa 16 kDa konnte als Myelin-Basisches Protein identifiziert werden und es zeigte sich für dieses ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,029$ ). In beiden Glaukomgruppen konnte eine höhere Antikörperreaktivität bei 16 kDa im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei circa 49 kDa konnte das Antigenband als Vimentin identifiziert werden. Die Antikörperreaktivität gegen Vimentin zeigte sich in beiden Glaukomgruppen gegenüber der Vergleichsgruppe herunterreguliert ( $p = 0,030$ ).

Quelle: (52)

Während Autoantikörper in erhöhter Konzentration vermutlich autoaggressiv wirken, wird angenommen, dass die herunterregulierten Autoantikörper zu einem Verlust von regulatorischen Funktionen und somit zu einer erhöhten Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen führen können (22, 55).

In Studien der Arbeitsgruppe um Grus et al. wurde der Effekt von verschiedenen Antikörpern, welche bei Glaukompatienten in geringerer Konzentration als bei Gesunden vorkommen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Antikörper in geringen Konzentrationen, welche die im Körper eines Gesunden vorhandene Konzentration widerspiegeln sollten, eine schützende Wirkung auf neuroretinale Zelllinien, welche mit Glutamat oder Wasserstoffperoxid gestresst wurden, haben (56). Dazu zählen Antikörper gegen  $\gamma$ -Synuklein, 14-3-3-Protein und GFAP (Glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein). Wurden die genannten Zellen mit diesen Antikörpern inkubiert, bevor sie Wasserstoffperoxid ausgesetzt wurden, so zeigte sich eine erhöhte Zellviabilität sowie eine verminderte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Vergleich zu nicht präinkubierten Zellen (56).



Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörper zeigten ebenfalls protektive Effekte auf Zellen, welche mit Glutamat gestresst wurden. Auch bei diesen konnte durch eine Präinkubation ein erhöhtes Zellüberleben erreicht werden (56). Nachfolgend durchgeführte massenspektrometrische Analysen zeigten Veränderungen des intrinsischen apoptotischen Signalwegs, wobei eine Herunterregulierung von pro-apoptotisch sowie eine Hochregulierung von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen nachgewiesen werden konnte (56, 57).

In einer weiteren Studie konnte ein protektiver Effekt von Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörpern und Anti-GFAP-Antikörpern auch für primäre retinale Ganglienzellen in einer ex-Vivo Retinakultur von adulten Schweineretinae gezeigt werden. Nach Inkubation der Retinaexplantate mit Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörpern und Anti-GFAP-Antikörpern konnte ein signifikant höheres Überleben der RGCs als nach der gleichen Inkubationszeit ohne zugefügten Antikörper oder mit einem Kontrollantikörper gezeigt werden (58). Der neuroprotektive Effekt von Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörpern und Anti-GFAP-Antikörpern auf primäre retinale Ganglienzellen ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

In massenspektrometrischen Untersuchungen der Schweineretinae, welche mit Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörpern und Anti-GFAP-Antikörpern inkubiert wurden, konnte eine erhöhte Expression der Glutamin-Synthetase nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine Verlagerung der Glutamin-Synthetase innerhalb der Müller-Zellen in Richtung der retinalen Ganglienzellschicht. Daraus wurde gefolgert, dass die Antikörper nicht nur direkt, sondern auch indirekt über die Müller-Zellen schützend auf die retinalen Ganglienzellen wirken (58).

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Antikörpern an der Pathogenese des Glaukoms konnte durch die Untersuchung und den Vergleich von Retinae, welche von verstorbenen Glaukompatienten sowie von verstorbenen Personen ohne Augenerkrankungen stammten, gewonnen werden. In dieser Studie konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl von retinalen IgG-Ansammlungen zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. In der Ganglienzellschicht von Retinae, welche von Glaukompatienten stammten, zeigten sich annähernd doppelt so viele dieser Ansammlungen wie bei der Kontrollgruppe ( $9,4 \pm 1,9$  IgG-Ansammlungen pro 100 Zellen vs.  $5,0 \pm 0,5$  IgG-Ansammlungen pro 100 Zellen) (59). Diese Ansammlungen waren in einem proinflammatorischen Umfeld zu finden, welches wahrscheinlich durch Mikroglia-Zellen aufrechterhalten wird (22, 59). Zusätzlich konnten in den Retinae aus der Glaukom-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe CD27<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden, von welchen einige als Plasmazellen (CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>) identifiziert werden konnten (59). Im Tiermodell zeigte sich, dass Antikörper, welche bei Glaukompatienten erhöht sind, wie Anti-Hitzeschockprotein 60 (Anti-Hsp60) und Anti-Myelin-Basisches Protein (Anti-MBP), einen autoaggressiven Verlust von retinalen Ganglienzellen hervorrufen (22, 60, 61). Im Einklang mit den oben genannten Erkenntnissen konnte festgestellt werden, dass solche Antikörper mit IgG-Ablagerungen sowie mit einer erhöhten Anzahl von Mikrogliazellen assoziiert sind (22, 61, 62).

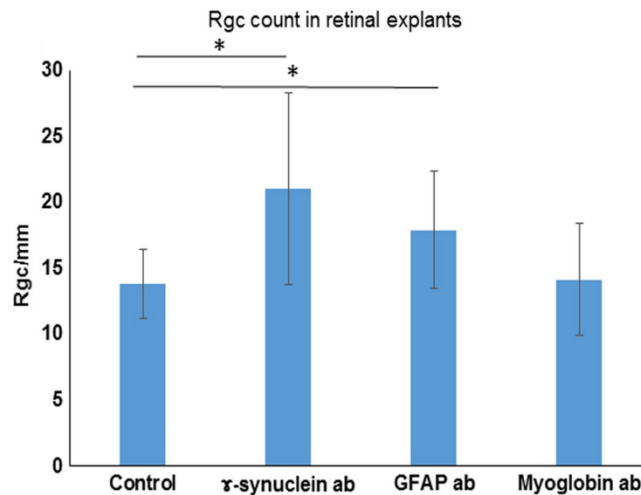


Abbildung 4: Einfluss der Antikörper gegen  $\gamma$ -Synuklein und GFAP auf die Anzahl retinaler Ganglienzellen

Schweineretinae wurden für 24 Stunden in einem Kontrollmedium ohne Antikörper (Control) oder in Medium, dem 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörper ( $\gamma$ -synuclein ab) beziehungsweise 1  $\mu\text{g/ml}$  Anti-GFAP-Antikörper (GFAP ab) zugefügt waren, inkubiert. Als Isotypenkontrolle wurden Schweineretinae außerdem in Medium inkubiert, dem 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Anti-Myoglobin-Antikörper zugesetzt war (Myoglobin ab). Die Retinae wurden fixiert, eingebettet und immunhistologisch gefärbt. Die Zellen wurden manuell gezählt und mithilfe der Software ImageJ quantifiziert. ( $*p < 0,05$ ; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). In der Abbildung wird die jeweilige Anzahl von retinalen Ganglienzellen pro Millimeter dargestellt. Eine signifikant höhere Anzahl an retinalen Ganglienzellen (Rgc) konnte nach der Inkubation mit Anti- $\gamma$ -Synuklein-Antikörper (Rgc/mm = 20,8) und mit Anti-GFAP-Antikörper (Rgc/mm = 20,1) nachgewiesen werden als nach der Inkubation ohne zugesetzte Antikörper (Rgc/mm = 13,8) beziehungsweise nach der Inkubation mit dem Kontroll-Antikörper gegen Myoglobin (Rgc/mm = 14,15).

Quelle: Abgeändert nach (58)

Weitere Erkenntnisse über das natürliche Autoantikörper-Repertoire und über POAG-spezifische Veränderungen bietet eine kürzlich veröffentlichte Studie der Arbeitsgruppe um Grus et al. (63). Hier wurden mithilfe einer massenspektrometrie-basierten antikörpervermittelten Methode Autoantigene identifiziert (MS-AMIDA, Mass spectrometry-based antibody-mediated identification of autoantigens), welche potenziell mit dem primären Offenwinkelglaukom in Verbindung stehen. Von den 106 identifizierten Autoantigenen schienen 21 mit dem POAG assoziiert zu sein. Bioinformatische Analysen der POAG-assoziierten Autoantigene zeigten eine ausgeprägte Verbindung zum Platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) Signalweg, welcher mutmaßlich eine essenzielle Rolle bei der Fibrose des Trabekelmaschenwerk spielt. Weiterhin konnte in dieser Studie eine erhöhte Konzentration von Autoantikörpern gegen Threonin-tRNA Ligase (TARS), Component 1 Q Subcomponent-binding Protein (C1QBP) sowie Paraneoplastisches Antigen Ma2 (PNMA2) nachgewiesen werden, welche künftig als mögliche Biomarker für das Glaukom dienen könnten (63).

In einer weiteren Studie, welche bereits zuvor in der Literatur beschriebene Glaukom-assoziierte Antigene zusammenfasste und mittels bioinformatischer Analysen untersuchte, konnten neue Erkenntnisse zu möglichen pathogenetischen Vorgängen gewonnen werden. Die untersuchten Antigene waren bereits im Vorfeld von verschiedenen Arbeitsgruppen als mögliche Ziele der glaukomassoziierten Autoimmunität identifiziert worden. Mithilfe des Metascape Algorithmus MCODE (Molecular Complex Detection) gelang der Nachweis von sechs Antigenen, welche ein besonders starkes Netzwerk bilden. In Abbildung 5 ist dies graphisch dargestellt.

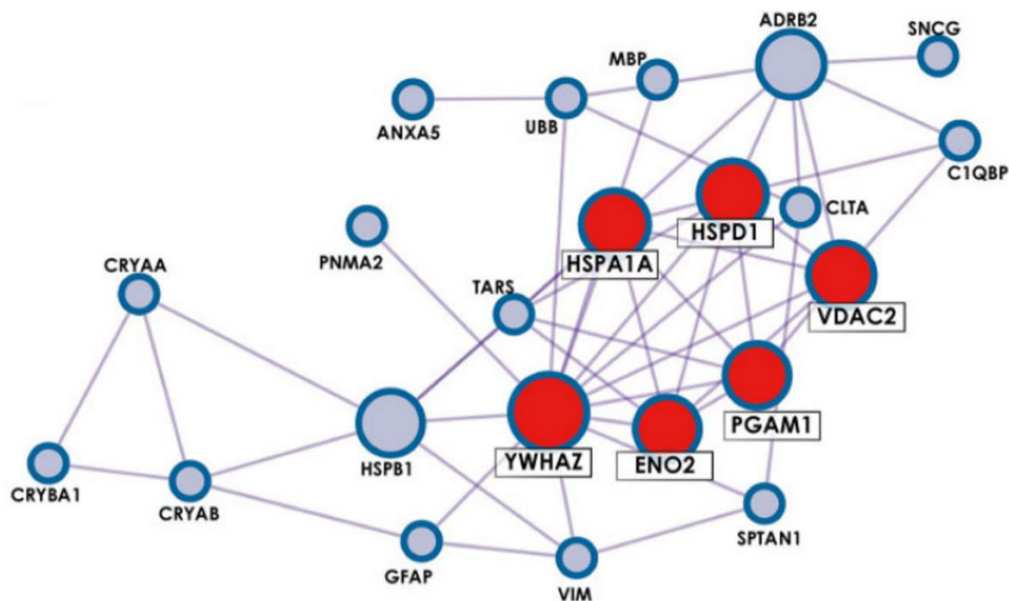


Abbildung 5: Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk glaukomassoziiierter Autoantigene

Holistische Darstellung der bioinformatischen Analyse von zuvor beschriebenen Autoantigenen, welche mit dem Glaukom assoziiert sind. Im gezeigten Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk wird deutlich, dass 22 der 28 glaukomassoziierten Antigene mindestens einen Interaktionspartner innerhalb der Gruppe haben. Für sechs der Antigene (HSPA1A, HSPD1, YWHAZ, ENO2, PGAM1 und VDAC2) konnte mithilfe des MCODE Algorithmus eine besonders starke Interaktion nachgewiesen werden (rot markiert).

Quelle: Abgeändert nach (64)

Diese sechs Antigene (HSPA1A, HSPD1, YWHAZ, ENO2, PGAM1 und VDAC2) können hauptsächlich mit Mitochondrien und apoptotischen mitochondrialen Veränderungen in Verbindung gebracht werden (64). Apoptose wird allgemein als Hauptursache des retinalen Ganglienzellverlusts angesehen und es wird vermutet, dass Apoptose durch mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Glaukoms spielt (65-68). Überraschenderweise zeigte sich, dass vier der sechs Antigene auch in Myelinscheiden zu finden sind. Die Autoren folgerten daraus, dass vermutlich antikörpervermittelte Schäden der Myelinscheide des Sehnervens hinter der Lamina Cribrosa ebenfalls eine Ursache für die Nervenschädigung beim Glaukom sind (64, 69).

Zusammengefasst konnten sowohl Unterschiede im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem sowie lokale Veränderungen in der Retina von Glaukompatienten im Vergleich zu nicht erkrankten Personen nachgewiesen werden (22). Es ist also bereits erwiesen, dass das Immunsystem und insbesondere die Autoimmunität eine wichtige Rolle beim Glaukom spielt (23). Diese Erkenntnisse bergen ein großes diagnostisches und auch therapeutisches Potenzial. Um dieses Potenzial schließlich nutzen zu können, ist das weitere Verständnis des Immunsystems und der Autoimmunität im Rahmen der Pathogenese des Glaukoms derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die Rolle der regulatorischen B-Zellen bei der Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms wurde bislang nicht untersucht. Aufgrund ihrer Eigenschaft, die Differenzierung von pro-inflammatorischen Lymphozyten zu hemmen sowie ihrer Funktion, die Bildung regulatorischer T-Zellen zu fördern, wird vermutet, dass sie als immunsuppressive Zellen einen wichtigen Anteil an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz innehaben (70). Bei anderen Erkrankungen mit einer autoimmunen Komponente, wie etwa der Rheumatoiden Arthritis, der Multiplen Sklerose oder dem Systemischen Lupus Erythematodes, konnten Veränderungen der regulatorischen B-Zellen nachgewiesen werden (41, 71, 72). So zeigte sich bei der Rheumatoiden Arthritis sowie bei der Multiplen Sklerose eine verminderte Anzahl an regulatorischen B-Zellen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden (48, 72). Eine weitere Studie ergab, dass die Anzahl an regulatorischen B-Zellen im Blut von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes sich nicht von der Anzahl bei gesunden Probanden unterscheidet, die Funktionsfähigkeit der regulatorischen B-Zellen allerdings eingeschränkt ist (41).

Ziel der hier vorgelegten Studie war es daher, die Beteiligung von regulatorischen B-Zellen an der Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms durch den Nachweis von im Folgenden dargestellten Veränderungen festzustellen. Es sollte überprüft werden, ob – wie aufgrund der Ergebnisse der oben beschriebenen Studien zu vermuten war – die Anzahl der regulatorischen B-Zellen sowie die Konzentration von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 im Blut von POAG-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt sind. Weiter sollte herausgefunden werden, ob die Fähigkeit zur Reaktion auf Stimulation bei B-Zellen von Glaukompatienten verringert ist, so dass durch eine In-vitro-Stimulation weniger B-Zellen zu regulatorischen B-Zellen differenzieren sowie deren Zytokinproduktion im Vergleich zu Gesunden verringert ist. Zur Validierung dieser Arbeitshypothesen wurde sowohl Glaukompatienten als auch nicht erkrankten Probanden Blut abgenommen und dieses auf Unterschiede hin untersucht.

Zur Bestimmung der Anzahl der regulatorischen B-Zellen erfolgte zunächst die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes. Die darin enthaltenen B-Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie detektiert. Anhand spezifischer Oberflächenmerkmale konnten verschiedene B-Zell-Subpopulationen, darunter auch regulatorische B-Zellen, unterschieden und quantifiziert werden. Zusätzlich wurde ein Teil der isolierten mononukleären Zellen in

Kultur genommen und mithilfe von In-vitro-Stimulation zur Differenzierung sowie Zytokinproduktion angeregt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Anzahl der regulatorischen B-Zellen nach der Zellkultur abermals mittels Durchflusszytometrie. Die Konzentrationen verschiedener Zytokine wurden sowohl im Serum als auch nach In-vitro-Stimulation mithilfe einer Microarray-Analyse ermittelt und zwischen Glaukompatienten und gesunden Probanden verglichen. In Abbildung 6 ist eine Übersicht über die verschiedenen Arbeitsschritte der vorliegenden Studie dargestellt.

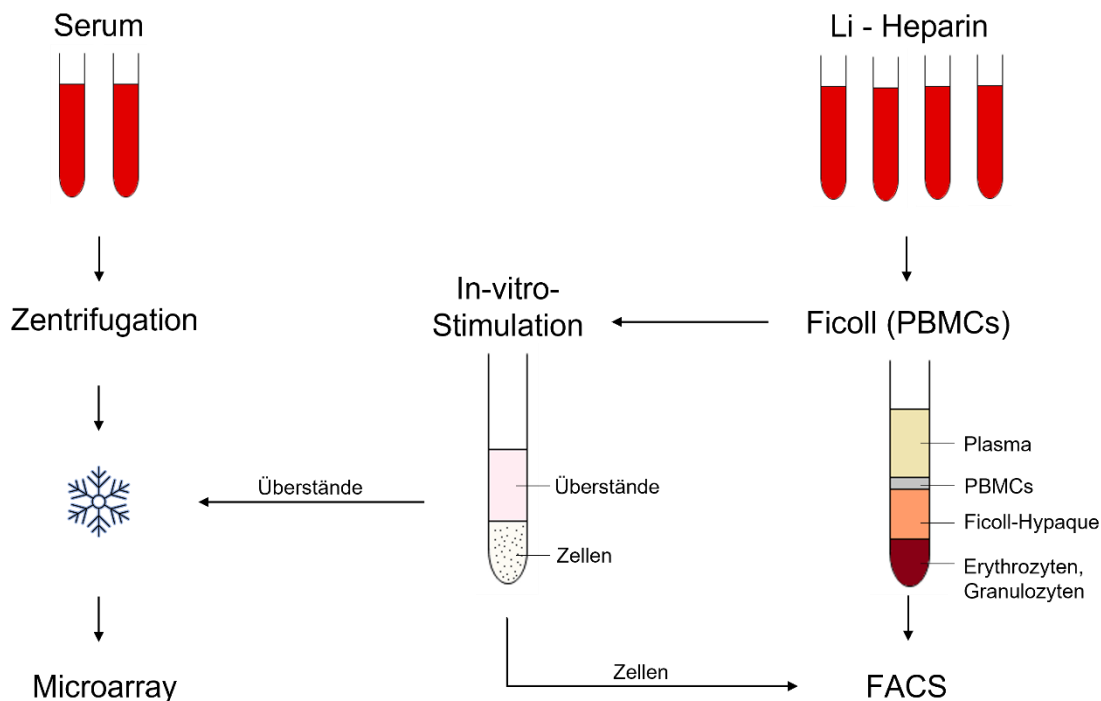


Abbildung 6: Workflow über die Teilschritte dieser Arbeit

Die Abbildung vermittelt eine Übersicht über die durchgeführten Teilschritte der vorliegenden Arbeit. Jedem Teilnehmer an der Studie wurden zwei Serum-Röhrchen (Serum) sowie vier Lithium-Heparin-Röhrchen (Li-Heparin) Blut abgenommen. Nach Zentrifugation der Serum-Röhrchen erfolgte das Einfrieren der gewonnenen Serumproben bis zur Microarray-Analyse (Microarray). Aus den Lithium-Heparin-Röhrchen konnten nach verschiedenen Arbeitsschritten mithilfe der Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isoliert werden. Diese wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert, so dass mittels Durchflusszytometrie (FACS) die enthaltenen B-Zell-Subpopulationen inklusive der regulatorischen B-Zellen detektiert und quantifiziert werden konnten. Ein Teil der isolierten mononukleären Zellen wurde zunächst zur In-vitro-Stimulation in Kultur genommen. Die Überstände aus dieser Kultur wurden ebenfalls bis zur Microarray-Analyse eingefroren. Die stimulierten Zellen wurden analog zu den PBMCs gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In Kapitel 3 ist eine ausführliche Beschreibung aller gezeigten Schritte dargestellt.

Quelle: Eigene Abbildung

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Materialien, Chemikalien und Geräte

Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit - 3KDa cutoff (Merck Millipore)

Antikörper:

- Anti-CCL2 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-CTGF antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-CXCL8 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-CYR61 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-EGF antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-HMGB1 in Kaninchen hergestellte Antikörper (Sigma-Aldrich)
- Anti-IL-1 alpha antibody, Rabbit polyclonal to IL-1 alpha (Abcam)
- Anti-IL-10 antibody ab10775, Goat polyclonal to IL-10 (Abcam)
- Anti-IL13 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-IL18 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-IL33 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)
- Anti-Interleukin-4 antibody produced in goat (Sigma-Aldrich)
- Anti-Interferon- $\gamma$  antibody produced in goat (Sigma-Aldrich)
- Anti-Phospholipase A2, Secretory Group V antibody, Mouse monoclonal (Sigma-Aldrich)
- Anti-RANTES antibody ab10590 (CCL5), Goat polyclonal to RANTES (Abcam)
- Anti-TGFB2 antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich)
- Anti-TNF alpha antibody, Rabbit polyclonal to TNF alpha (Abcam)
- Anti-VEGFA antibody, Rabbit polyclonal to VEGFA (Abcam)
- Interleukin 8 antibody (IL8) Mouse anti Human (antibodies-online Inc., Limerick, USA)
- Monoclonal Anti-PLA2G7 antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich)
- Monoclonal Anti-TGFB1 antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich)
- Mouse Anti-Human CD19 FITC (4G7) (BD Biosciences)
- Mouse Anti-Human CD24 PE (BD Biosciences)
- Mouse Anti-Human CD38 PE-Cy<sup>TM</sup>5 (BD Biosciences)
- Purified anti-human IL-6 Antibody (BioLegend, San Diego, USA)

Aqua destillata

Augen vom Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) (Landmetzgerei Harth, Stackeden-Elsheim)

Blocking Buffer SuperG<sup>TM</sup> (Grace Bio-Labs, Bend, USA)

Brutschrank CO2-Inkubator (Thermo Fisher Scientific)

Butterfly Venofix® Safety Venenpunktionsbesteck (B. Braun Melsungen AG)

Dulbecco's phosphate-buffered saline Gibco® (PBS) Without Calcium and Magnesium (Thermo Fisher Scientific)

Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ (BD Biosciences)

DyLight™ 650 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific)

DyLight™ 550 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific)

Ethanol 96 % denatured with IPA, MEK and Bitrex pure (AppliChem GmbH)

Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt Dihydrate (EDTA) (Sigma-Aldrich)

FACSClean (BD Biosciences)

FACSFlow™ Trägerflüssigkeit (BD Biosciences)

FACSRinse (BD Biosciences)

Federschere rostfrei, nach oben gebogen (Geuder AG, Heidelberg)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich)

Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden)

Gefäße:

- 0,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes farblos (Eppendorf AG)
- 0,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes ambra (Lichtschutz) (Eppendorf AG)
- 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes farblos (Eppendorf AG)
- 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes ambra (Lichtschutz) (Eppendorf AG)
- 2 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes farblos (Eppendorf AG)

Glycerol 87 % for analysis (AppliChem GmbH)

Handschuhe SEMPERCARE Nitrile powder-free examination gloves, latexfrei (Sempermed)

Hepes sodium salt (Sigma-Aldrich)

Homogenisator Precellys® 24 (VWR International GmbH, Darmstadt)

Inkubationskammern ProPlate® Multi-Well Chambers (Grace Bio-Labs, Bend, USA)

Kühl-/Gefrierkombination Premium (Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen)

L-Alanyl-L-Glutamine 200mM (Biochrom GmbH)

Microarray slides, nitrocellulose coated, ONCYTE® AVID 16 NC pads (Grace Bio-Labs, Bend, USA)

Microtiterplatte Nunc 6-Well Plate (Thermo Fisher Scientific)

Microtiterplatte V-bottomed 96-Well Storage Plate (Thermo Fisher Scientific)

Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)

Multi-Adapter für S-Monovette® (Sarstedt)

Multiskan™ Ascent (Thermo Fisher Scientific)

Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg-Filtrationsgeräte mit PES-Membran (Thermo Fisher Scientific)

Natriumazid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Natriumtetraborat Decahydrat (Sigma-Aldrich)

Octeniderm® farblos Alkoholisches Hautantiseptikum (Schülke & Mayr GmbH)

ODN 2006 Class B CpG oligonucleotide (TLR9 Ligand) (InvivoGen, San Diego, CA, USA)

Penicillin-Streptomycin Solution (Sigma-Aldrich)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

Pinsel Kunstfaser rund, Größe 2 (van Eyck, Rotterdam, Niederlande)

Precellys® Keramik-Kit 1,4/2,8 mm, 50× 2 ml Tubes, befüllt mit Keramik-Gemisch (VWR International GmbH, Darmstadt)

pH-Meter Mikroprozessor pH-mV-Meter pH 526 (Xylem Analytics/WTW, Weilheim)

pH-Elektrode SenTix® 21 (Xylem Analytics/WTW, Weilheim)

Pipetten:

- 0,5 - 10 µL Pipette Eppendorf Research® (Eppendorf AG)
- 10 - 100 µL Pipette Eppendorf Research® (Eppendorf AG)
- 100 - 1,000 µL Pipette Eppendorf Research® (Eppendorf AG)
- 3,5 ml Transferpipette (Sarstedt)
- 5 ml Cellstar® Serologische Pipette (Greiner Bio-One International GmbH)
- 10 ml Cellstar® Serologische Pipette (Greiner Bio-One International GmbH)
- 25 ml Cellstar® Serologische Pipette (Greiner Bio-One International GmbH)

Pipettenspitzen:

- 0,1 – 10 µL epT.I.P.S. (Eppendorf AG)
- 2 – 200 µL epT.I.P.S. (Eppendorf AG)
- 50 – 1000 µL epT.I.P.S. (Eppendorf AG)

Pipettierhilfe Pipetus® Akku (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt)

Röhrchen:

- 5 ml Falcon® Round-Bottom Polystyrene Tubes (Becton Dickinson Labware)
- 15 ml Cellstar® Tubes (Greiner Bio-One International GmbH)
- 50 ml Cellstar® Tubes (Greiner Bio-One International GmbH)

RPMI 1640 without L-glutamine (Biozym Scientific GmbH)

SciFLEXARRAYER S3 piezo driven, non-contact dispenser (Scienion, Berlin)

SensoSpot® Microarray Analyzer (Miltényi Imaging GmbH, Radolfzell)

Sicherheitswerkbank Holten Laminair Model 1.2 (Thermo Fisher Scientific)



Skalpelli Feather Disposable Scalpel No. 11/No. 21 (Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan)

S-Monovette® 7,5 ml, Lithium-Heparin (Sarstedt)

S-Monovette® 7,5 ml, Serum-Gel mit Gerinnungsaktivator (Sarstedt)

Sodium Pyruvate 100 mM Solution (Sigma-Aldrich)

Soluble Cluster of Differentiation 40 Ligand (sCD40L) (antibodies-online GmbH, Aachen)

Thermomixer HLC KTMR-133 (Haep Labor Consult, Bovenden)

T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan PUFFERAN® ≥99,9 %, p.a. (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Trypan Blue Solution 0,4 % (Sigma-Aldrich)

TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich)

Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf AG)

VE-Wasser

Waage H51-D (Sartorius AG)

Wasserbad WBT 12 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Water HPLC grade (AppliChem GmbH)

Zählkammer Neubauer-improved 0,1 mm Kammertiefe (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)

Zeba™ Spin Desalting Plates, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific)

Zentrifuge 5810 R (Eppendorf AG)

Zellstofftupfer Zelleten (Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG)

### **3.1.2 Software**

Ascent™ Software 2.6 (Thermo Scientific™)

BD CellQuest Pro™ Software (BD Biosciences)

ImaGene™ 5.5, BioDiscovery Inc. (Los Angeles, USA)

Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (16.0.14026.20202) 32-Bit

TIBCO Statistica® 13 (Statsoft Europe, Hamburg)

### 3.1.3 Puffer und Medium

- EDTA-Puffer:
- PBS
  - 2 mM EDTA
- pH-Wert: 7,2
- Wasch-Puffer:
- PBS
  - 0,1 % Natriumazid
- Medium:
- RPMI 1640
  - 10 % FBS
  - 1 % L-Alanyl-L-Glutamine
  - 1 % Penicillin-Streptomycin
  - 1 % Natrium Pyruvate
  - 10 mM/L Hepes
- pH-Wert: 7,4
- Labelling-Puffer:
- VE-Wasser
  - 0,05 M Natriumtetraborat Decahydrat
- pH-Wert 8,5
- PBST:
- PBS
  - 0,5 % Tween-20
- Spotting Puffer:
- PBS
  - 0,01 % Tween-20
  - 0,5 % Glycerol
- pH-Wert 8,5

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Patienten und Probanden

In diese Studie wurden 14 Patienten und 16 gesunde Vergleichspersonen eingeschlossen. Die Patienten waren an einem primären Offenwinkelglaukom, nach der Definition der „European Glaucoma Society“, erkrankt (siehe Abschnitt 2.2.1). In die Studie eingeschlossen wurden Patienten sowohl mit beginnendem, mäßigem also auch mit schwerem glaukomatösen Gesichtsfelddefekt. Der Schweregrad wurde dabei in Anlehnung an die Hoddap-Parrish-Anderson-Klassifikation anhand des Mean Defect (MD) definiert (beginnend: MD < 6 dB; mäßig: 6 - 12 dB; schwer: > 12 dB) (73, 74). Zur Ermittlung des MD wurde jeweils die aktuelle Gesichtsfelduntersuchung, welche mit dem Octopus Perimeter der Firma Haag-Streit Diagnostics durchgeführt wurde, herangezogen (75).

Als Ausschlusskriterien für beide Gruppen galten Allergien, Stoffwechselerkrankungen und Erkrankungen, bei denen eine autoimmune Genese bekannt ist oder vermutet wird. Weiterhin wurden Patienten ausgeschlossen, deren POAG bereits durch eine Laserbehandlung oder Operation therapiert wurde und solche, die einen retinalen Gefäßverschluss, ein Makulaödem, eine Netzhautablösung oder einen Glaukomanfall in der Vorgeschichte hatten. Die gesunden Vergleichspersonen durften an keiner Erkrankung der Augen leiden. Mit diesen strengen Ausschlusskriterien bezüglich systemischer Erkrankungen sollte die Zahl an potenziellen Einflussfaktoren so gering wie möglich gehalten werden.

Die an der Studie teilnehmenden erkrankten Personen waren alle Patienten der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz, welche zur Tagesdruckprofilmessung stationär aufgenommen waren. Nach der Optimierung von Methoden und Protokollen der experimentellen Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten täglich sämtliche stationäre Patienten der Augenklinik auf eine mögliche Teilnahme an der Studie hin gescreent. Aufgrund der strengen Ein- und Ausschlusskriterien konnte nur ein kleiner Teil der gescreenten Patienten in die Studie aufgenommen werden. Zeitgleich wurden auch gesunde Probanden gescreent und rekrutiert, wobei darauf geachtet wurde, dass eine ähnliche Verteilung der Merkmale Alter und Geschlecht zwischen den Gruppen herrschte. Alle Studienteilnehmer waren zwischen 50 und 75 Jahre alt. Eine Aufstellung über die Anzahl, das Geschlecht und das Alter der Studienteilnehmer ist in Tabelle 1 zu sehen.

Tabelle 1: Anzahl, Geschlecht und Alter der Studienteilnehmer

	Patienten	Probanden
Anzahl	14	16
Geschlecht (m/w)	8/6	9/7
Mittelwert Alter ( $\pm$ SD)	61,1 ( $\pm$ 7,82)	61,3 ( $\pm$ 7,35)

Quelle: Eigene Darstellung

Die Patienten und Probanden wurden in einem persönlichen Gespräch über den Hintergrund der Studie, die durchzuführenden Maßnahmen bei Teilnahme sowie über mögliche Risiken aufgeklärt. Außerdem wurde ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Studienteilnahme freiwillig sei und ihnen bei Ablehnung keinerlei Nachteile entstünden. Nach der schriftlichen informierten Einwilligung über die Gewinnung und Untersuchung von Blutproben sowie über die Erhebung studienbezogener anonymisierter Gesundheitsdaten wurden die Patienten und Probanden in die Studie eingeschlossen.

### **3.2.2 Blutabnahme**

Den Patienten und Probanden wurden jeweils vier Lithium-Heparin- und zwei Serum-Röhrchen Blut abgenommen. Dazu wurde zunächst eine geeignete Punktionsstelle gesucht und ein Stauschlauch an den betroffenen Arm angelegt. Es erfolgte eine Wischdesinfektion sowie eine direkt daran anschließende Sprühdesinfektion der Punktionsstelle mit einem alkoholischen Hautantiseptikum. Nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden erfolgte die Punktion der Vene mit einer Butterfly-Kanüle und die Blutentnahme. Nach Befüllung aller Röhrchen wurde der Stauschlauch gelöst und die Kanüle entfernt, gesichert und abgeworfen. Die Punktionsstelle wurde mit einem Tupfer komprimiert und im Anschluss mit einem Pflaster bedeckt. Da die Patienten stationär in der Augenklinik aufgenommen waren und auch die Probanden zur Blutabnahme in die Klinik der Universitätsmedizin kamen, betrug die Dauer zwischen Abnahme und Beginn der Untersuchung lediglich fünf bis zehn Minuten.

### **3.2.3 Gewinnung von Serumproben**

Die Serum-Röhrchen wurden 30 Minuten gerinnen gelassen. Während dieser Zeit standen sie aufrecht. Danach wurden die Röhrchen in der bereits auf 4 Grad vorgekühlten Zentrifuge bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert (76). Die verwendeten Serum-Röhrchen enthalten ein Polyacrylester-Gel, welches sich durch die Zentrifugation aufgrund seiner Dichte zwischen Serum und Blutkuchen sammelt. Dadurch entsteht eine stabile Trennschicht zwischen beiden Bestandteilen und das Serum kann ohne Verunreinigungen abpipettiert werden (77). Pro Patienten und Probanden wurden 5 ml Serum zu je einem Milliliter abgenommen und bei - 20 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren.

### **3.2.4 Isolation Mononukleärer Zellen**

Für die weiteren Versuche wurden die mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) benötigt. Diese beinhalten Monozyten und Lymphozyten. Für die Isolierung dieser Zellen wurde die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Bei dieser Methode wird als Zellseparationsmedium Ficoll-Hypaque verwendet. Die Dichte dieses Mediums überschreitet die Dichte von PBMCs und Thrombozyten, aber unterschreitet die von Erythrozyten und den meisten Granulozyten. Somit sammeln sich die Erythrozyten und Granulozyten durch die Zentrifugation am Boden des Röhrchens, während die PBMCs sich als Schicht oberhalb des Ficoll-Hypaque darstellen. Da sich die Dichten der Blutzellen teilweise überschneiden, muss davon ausgegangen werden, dass die PBMC-Schicht durch vereinzelte basophile Granulozyten kontaminiert ist (78, S. 53 ff.).

Um die Dichtegradientenzentrifugation durchzuführen, wurde das Blut aus den Lithium-Heparin-Röhrchen zunächst in einem Verhältnis von 1:1 mit EDTA-Puffer gemischt. Dieser bestand aus der phosphatgepufferten Salzlösung Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) mit einem Zusatz von 2 mM EDTA und wies einen pH-Wert von

7,2 auf. Von diesem verdünnten Blut wurden 30 ml vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass beide Phasen sich dabei nicht vermischten (vgl. Abbildung 7A). Es folgte der erste Zentrifugationsschritt bei 400 x g und 20 °C für 35 Minuten. Dabei wurde die Bremse ausgeschaltet, um ein Vermischen der aufgetrennten Schichten am Ende der Zentrifugation zu verhindern. Am Ende des Vorgangs hatten sich, von oben nach unten, folgende Schichten gebildet: Plasma, PBMCs, Ficoll-Hypaque und als unterste Schicht Erythrozyten und Granulozyten (vgl. Abbildung 7B). Um die Verunreinigung der PBMCs mit Thrombozyten zu reduzieren, welche sich durch ihre geringe Dichte zum größten Teil im Plasma sammeln, wurde diese Schicht als erstes abgenommen (vgl. Abbildung 7C). Die darunter liegenden PBMCs konnten nun abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt werden. Es folgten mehrere Waschschrte in absteigenden Zentrifugationen, um die Kontamination der mononukleären Zellen mit Thrombozyten, Plasma und Ficoll-Hypaque zu minimieren (78, S. 53 ff.).

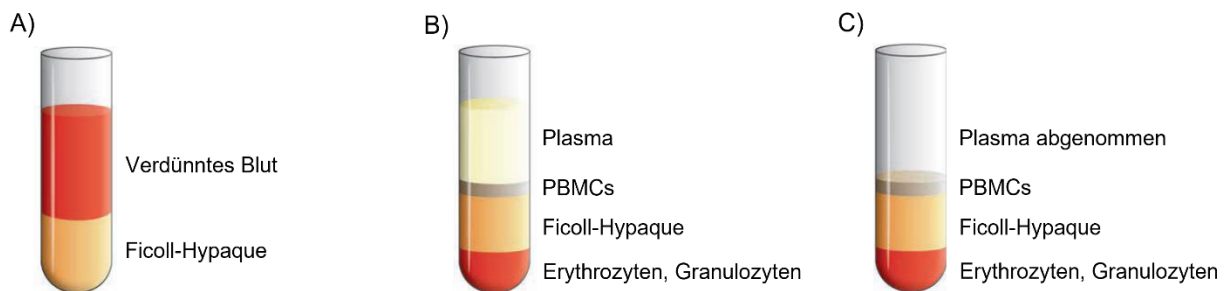


Abbildung 7: Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

(A) Auf Ficoll-Hypaque geschichtetes Blut (B) Auftrennung in Schichten nach der Zentrifugation (C) Freiliegende PBMCs-Schicht

Quelle: In Anlehnung an (79, S. 7)

### 3.2.5 Zellzahl-Bestimmung

Nun wurde die Anzahl der isolierten mononukleären Zellen bestimmt. Dazu wurden die gewaschenen PBMCs in einem Gesamtvolumen von 10 ml EDTA-Puffer resuspendiert und von dieser Zelllösung 10 µl entnommen. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt, um zwischen abgestorbenen und lebendigen Zellen zu differenzieren. Trypanblau kann nur durch die Zellmembran toter Zellen ins Zytosol eindringen und dieses blau färben, während intakte Zellen ungefärbt bleiben. Aus der Färbung mit Trypanblau ergibt sich ein Verdünnungsfaktor der Zelllösung von 2. Von der gefärbten Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun Großquadraten, von denen jeweils die Zellen in den vier Eckquadraten gezählt werden. In Abbildung 8 sind diese Eckquadrate farblich markiert (78, S. 59 f.).

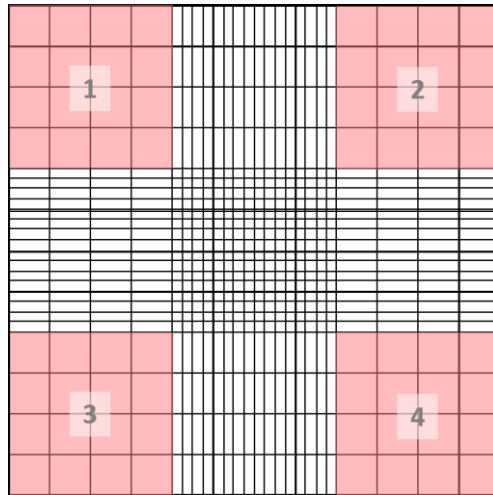


Abbildung 8: Neubauer-Zählkammer

Quelle: Eigene Abbildung

Aus den gezählten Zellen je Eckquadrat wird der Mittelwert gebildet. Jedes Großquadrat der Zählkammer hat ein Volumen von 0,1 µl, die Zellzahl pro Großquadrat ist somit die Zellzahl pro 0,1 Mikroliter. Um auf die Zellzahl pro Milliliter zu kommen, muss das Ergebnis des Mittelwertes mit  $10^4$  multipliziert werden. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl muss außerdem der Verdünnungsfaktor und das Gesamtvolumen berücksichtigt werden. Daraus ergeben sich folgende Formeln (78, S. 59 f.):

$$\text{Mittelwert} = \frac{\text{Eckquadrat}_1 + \text{Eckquadrat}_2 + \text{Eckquadrat}_3 + \text{Eckquadrat}_4}{4}$$

Der Mittelwert entspricht, wie oben erklärt, der Zellzahl pro 0,1 Mikroliter der gefärbten Zellsuspension.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um auf die Gesamtzellzahl zu kommen, muss die Zellzahl pro Milliliter mit dem Gesamtvolumen von 10 ml multipliziert werden.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl/ml} \times \text{Gesamtvolumen}$$

Ein Teil der isolierten PBMCs wurde direkt durchflusszytometrisch untersucht, während der andere Teil zunächst zur Stimulation in Kultur genommen wurde.

### 3.2.6 Durchflusszytometrische Messung

Die Durchflusszytometrie wird verwendet, um eine große Anzahl von Zellen schnell zu untersuchen und anhand der Merkmale Größe, Granularität und Oberflächeneigenschaften zu klassifizieren (78, S. 74 ff.).

#### 3.2.6.1 Funktionsweise des Durchflusszytometers

Die Funktion des Durchflusszytometers beruht darauf, dass Zellen in einer laminaren Strömung einzeln an einem Laser vorbei geleitet werden und durch die Streuung und Emission von Licht Informationen über die Zellen erfasst werden können. Um Zellen mit dem Durchflusszytometer zu messen, müssen diese in einer Einzelzellsuspension vorliegen. Diese Probenflüssigkeit wird mit Hilfe von Überdruck in die Messkuvette des Durchflusszytometers gedrückt und wird dort von einer Trägerflüssigkeit mitgerissen. Durch diesen Vorgang werden die Zellen vereinzelt und es entsteht ein laminarer Fluss der Probe. Der laminare Fluss ist essenziell, da nur so jede Zelle einzeln am Laser vorbeigeführt und untersucht werden kann. Der Laser ist das Kernstück des Durchflusszytometers. Trifft das Licht des Lasers auf eine Zelle, wird es teilweise gestreut und abgelenkt. Durch verschiedene Filter und Detektoren kann das abgelenkte Licht erfasst und ausgewertet werden. Eine Übersicht über den Aufbau des Durchflusszytometers wird in Abbildung 9 gezeigt.

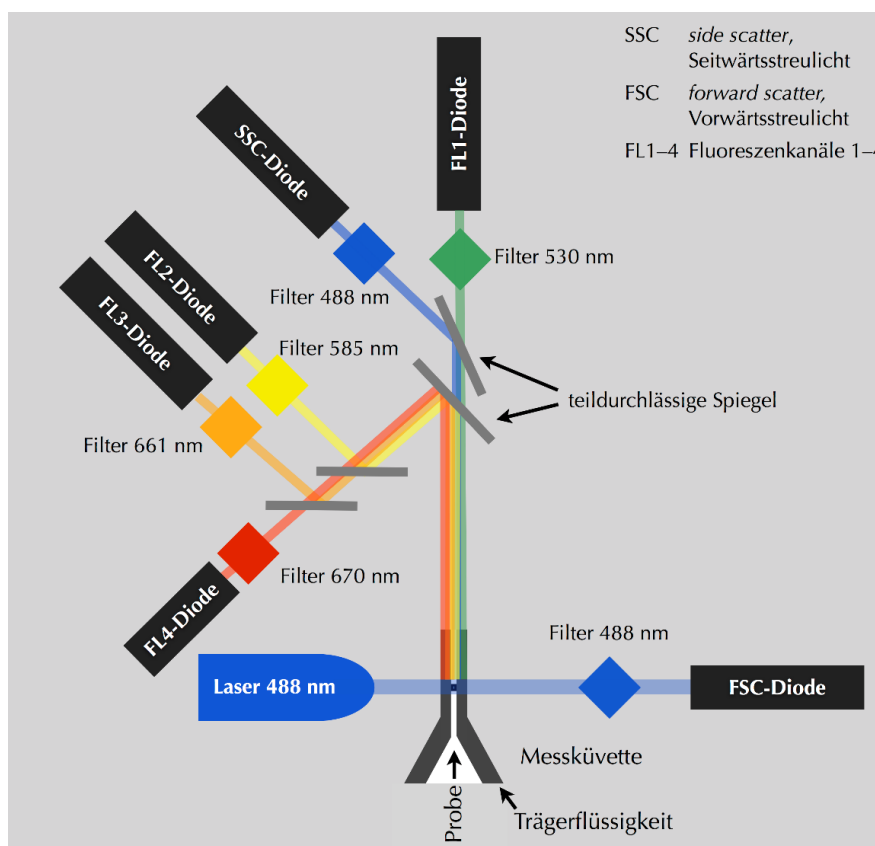


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Quelle: (80)

Licht, welches in Verlängerung der Richtung des Laserstrahls abgelenkt wird, dient zur Einschätzung der Größe der Zelle. Man nennt dieses auch Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC). Wird das Licht im rechten Winkel durch die Zelle abgelenkt, so spricht man von Seitwärtsstreulicht oder Sidescatter (SSC). Dies entsteht, wenn der Laserstrahl auf Strukturen innerhalb der Zelle trifft. Je mehr intrazelluläre Strukturen eine Zelle aufweist, desto stärker ist das Seitwärtsstreulicht. Man spricht dann von einer hohen Granularität der Zelle. Durch diese beiden Mechanismen können also Aussagen über die Größe und die Granularität einer Zelle getroffen werden. Damit kann man bei Blutzellen die folgenden Populationen unterscheiden: Lymphozyten (klein, geringe Granularität), Monozyten (größer, höhere Granularität) und Granulozyten (groß, hohe Granularität) (78, S. 74 ff.).

Eine weitere Eigenschaft des Durchflusszytometers ist es, auch Licht anderer Wellenlängen als der des Lasers herauszufiltern und zu detektieren. Werden die Zellen der Probe vor der Untersuchung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert, so können deutlich mehr Eigenschaften der Zelle als nur Größe und Granularität untersucht werden. Trifft das monochromatische Licht des Lasers auf den Fluoreszenzfarbstoff, so wird dieser angeregt und emittiert Licht einer anderen Wellenlänge. Welche Wellenlänge das emittierte Licht hat, hängt von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff ab. Die verwendeten Farbstoffe waren Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und das Tandemkonjugat PE/Cy5, welches aus den Farbstoffmolekülen Phycoerythrin und Cyanin-5.18 besteht (78, S. 74 ff.). Das in dieser Studie genutzte Durchflusszytometer war das BD FACS Calibur, welches einen Argonionenlaser der Wellenlänge 488 nm und einen Diodenlaser der Wellenlänge 635 nm besitzt. Alle verwendeten Farbstoffe werden durch das monochromatische Licht des Argonionenlasers angeregt.

In Abbildung 10 sind die jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome abgebildet, wobei die gestrichelten Linien jeweils das Absorptionspektrum angeben, also den Wellenlängenbereich, in dem das Fluorochrom angeregt werden kann. Der Farbstoff FITC hat sein Absorptionsmaximum bei 495 nm und kann somit gut durch den Argonionenlaser der Wellenlänge 488 nm angeregt werden. In der Abbildung 10 ist FITC grün dargestellt, da es nach der Anregung grünes Licht emittiert. Das grüne Licht wird im Durchflusszytometer durch einen speziellen Detektor im Fluoreszenzkanal 1 (FL1) gemessen. Der zweite Farbstoff war PE, welches ebenfalls durch den Argonionenlaser angeregt werden kann, dann aber gelbes Licht emittiert und in der Abbildung 10 gelb dargestellt ist. Das gelbe Licht wird im Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal 2 (FL2) gemessen. Der dritte Farbstoff war das Tandemkonjugat PE/Cy5. Bei einem Konjugat sind zwei Farbstoffmoleküle aneinandergeschlossen. Das erste Molekül, in diesem Fall PE, wird durch das Licht des Lasers angeregt und emittiert das für ihn typische gelbe Licht. Dieses fungiert sofort als Anregungslicht für das zweite Farbstoffmolekül, in diesem Fall Cyanin-5.18, und sorgt für eine Emission von rotem Licht. PE/Cy5 ist in der Abbildung 10 rot dargestellt und wird im Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal 3 (FL3) registriert (78, S. 74 ff.).



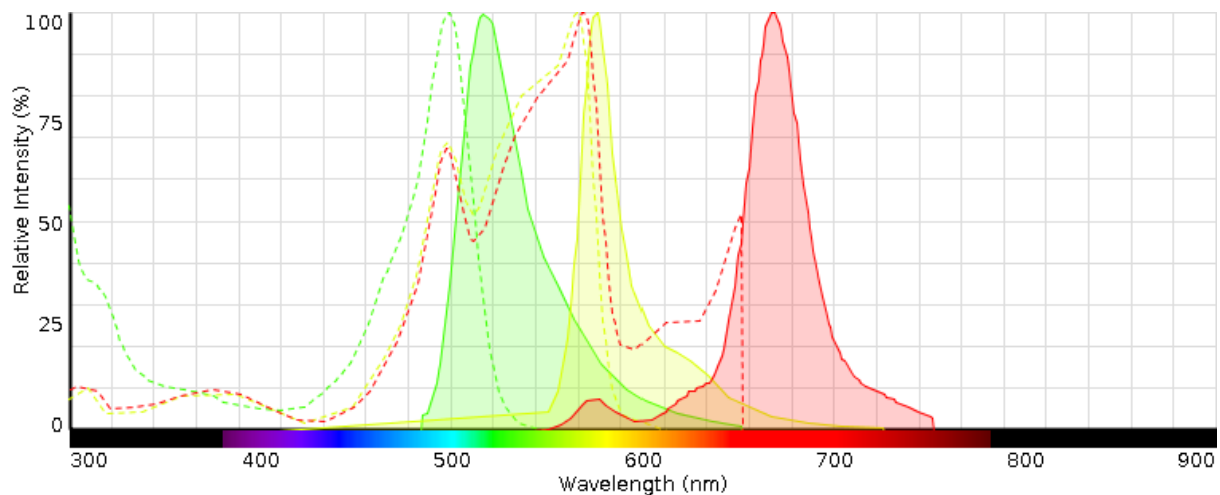


Abbildung 10: Absorptions- und Emissionsspektren von FITC, PE, PE/Cy5

Quelle: Erstellt mithilfe des Fluorescence SpectraViewer von Life Technologies (81)

### 3.2.6.2 Oberflächenmarkierung der Zellen

Ein Teil der isolierten mononukleären Zellen aus Punkt 3.2.4 wurde verwendet, um am Tag der Blutabnahme eine durchflusszytometrische Messung durchzuführen. Diese Messung diente dazu, die Anzahl und die Verteilung der verschiedenen B-Zell-Untergruppen, insbesondere der regulatorischen B-Zellen, bei Patienten mit POAG und gesunden Probanden zu bestimmen und zu vergleichen. Um die unterschiedlichen B-Zell-Untergruppen zu identifizieren, kann man sich die verschiedenen Oberflächenantigene der Zellen zunutze machen. Wie in Abschnitt 2.3.3.2 beschrieben, hat jede B-Zelle ein eigenes für sie charakteristisches Profil an Oberflächenmerkmalen. In dieser Studie wurden drei verschiedene Merkmale mithilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper können mit dem Durchflusszytometer detektiert werden und anhand der Messergebnisse können die untersuchten Zellen differenziert werden. Der erste der drei verwendeten Antikörper war gegen das Oberflächenantigen CD19 gerichtet und an den Farbstoff FITC gekoppelt (anti-CD19-FITC). Der zweite Antikörper markierte das Oberflächenantigen CD24 und war an PE gekoppelt (anti-CD24-PE) und der dritte richtete sich gegen CD38 und war mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE/Cy5 (anti-CD38-PE/Cy5) verbunden.

Als ersten Schritt der Oberflächenmarkierung wurden die PBMCs nach der Zellzahlbestimmung (Abschnitt 3.2.5) erneut bei 200 x g und 20 °C für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in Wasch-Puffer resuspendiert, so dass eine Konzentration von  $10^7$  Zellen pro Milliliter Puffer vorlag. Der Wasch-Puffer bestand aus PBS mit einem Zusatz von 0,1 % Natriumazid. Für die spätere Messung mit dem Durchflusszytometer wurden fünf verschiedene Proben vorbereitet. Die erste, Probe A, diente als ungefärbte Kontrolle. Dafür wurden 100 µl der in Wasch-Puffer suspendierten Zelllösung entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Proben B – D wurden

jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, um damit bei der durchflusszytometrischen Messung die Kompensation der Fluoreszenzsignale durchzuführen. Dies wird genauer im Punkt 3.2.6.3 beschrieben. Für Probe B wurden ebenfalls 100 µl der Zelllösung entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Da die Konzentration der Zellen im Wasch-Puffer  $10^7$  Zellen pro Milliliter Puffer betrug, wurden mit den 100 µl Lösung  $10^6$  Zellen entnommen. Diesen wurde 10 µl anti-CD19-FITC zugefügt. In gleicher Weise erfolgte die Färbung der Proben C und D. Es wurden jeweils 100 µl der Zelllösung entnommen und diese mit 10 µl anti-CD24-PE (Probe C) beziehungsweise 10 µl anti-CD38-PE/Cy5 (Probe D) versetzt. Für die Probe E wurden 200 µl der Zelllösung und damit  $2 \times 10^6$  Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt. Mit der Probe E wurde im Gegensatz zu den Proben A - D, welche der Kontrolle und Kompensation dienten, die eigentliche Messung der Zellen durchgeführt. Daher wurde hier das doppelte des Volumens und damit der gefärbten Zellen verwendet und so eine ausreichende Menge an Zellen für aussagekräftige Messungen sichergestellt. Die Einzelheiten der Messung und Auswertung sind in den Punkten 3.2.6.3 und 3.2.6.4 beschrieben. In Tabelle 2 wird übersichtlich dargestellt, welcher Antikörper welcher Probe zugefügt wurde.

Tabelle 2: Schema Oberflächenmarkierung

	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E
anti-CD19-FITC		X			X
anti-CD24-PE			X		X
anti-CD38-PE/Cy5				X	X

Probe A: ungefärbte Kontrolle, Probe B: mit anti-CD19-FITC gefärbt, Probe C: mit anti-CD24-PE gefärbt, Probe D: mit anti-CD38-PE/Cy5 gefärbt, Probe E: mit allen drei Antikörpern gefärbt

Quelle: Eigene Abbildung

Die fünf Eppendorfgefäße mit den Proben A - E wurden zur Inkubation für 25 Minuten bei 4 °C aufrechtstehend im Dunkeln gelagert. Nach der Inkubationszeit mussten überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt werden. Dazu wurde den Proben je 2 ml Wasch-Puffer zugegeben und sie wurden bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Zellpellets wurden erneut mit je 2 ml Wasch-Puffer resuspendiert und ein zweites Mal nach dem gleichen Schema zentrifugiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in je 500 µl Wasch-Puffer resuspendiert und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

### 3.2.6.3 Kompensation und Messung

Um die Proben korrekt zu messen, mussten zunächst einige Einstellungen am Durchflusszytometer vorgenommen werden. Als erstes wurde die ungefärbte Probe gemessen. Dies diente unter anderem dazu, die richtige Spannung und Verstärkung der FSC- und SSC-Detektoren einzustellen, so dass die zu untersuchende

Zellpopulation adäquat dargestellt wurde. Wie die korrekte Darstellung der Zellen in einem FSC/SSC-Dot-Plot nach diesen Einstellungen aussah, ist in Abbildung 11 zu sehen (82). Außerdem diente die Messung der ungefärbten Probe dazu, die Population an Lymphozyten einzugrenzen und so die Monozyten sowie Zelltrümmer von den folgenden Messungen auszuschließen. Dazu wurden die gemessenen Zellen in einem FSC/SSC-Dot-Plot anhand ihrer Merkmale Größe und Granularität aufgetragen. Die Population der Lymphozyten ließ sich anhand der in Punkt 3.2.6.1 beschriebenen Merkmale, klein und geringe Granularität, abgrenzen. Um diese Population wurde ein Gate gelegt, so dass in den späteren Messungen nur noch die Zellen, die innerhalb des Gates lagen, berücksichtigt wurden (78, S. 87 ff.). Ausgeschlossen wurden damit Monozyten, welche ebenfalls zu den PBMCs gehören. Diese sind aber größer und haben eine höhere Granularität, sodass sie etwas weiter rechts und oberhalb der Lymphozyten abgebildet werden. Möglicherweise befinden sich oberhalb der Monozyten sehr vereinzelt Granulozyten, welche aufgrund ihrer sich teilweise überschneidenden Dichten durch die Dichtegradientenzentrifugation nicht herausgefiltert wurden. Am linken unteren Rand des Dot-Plots werden lediglich Zelltrümmer dargestellt, welche ebenfalls für weitere Messungen ausgeschlossen werden (78, S. 87 ff.). Die verschiedenen Populationen der Lymphozyten, Monozyten und der Zelltrümmer sowie das Lymphozyten-Gate sind in Abbildung 11 dargestellt.

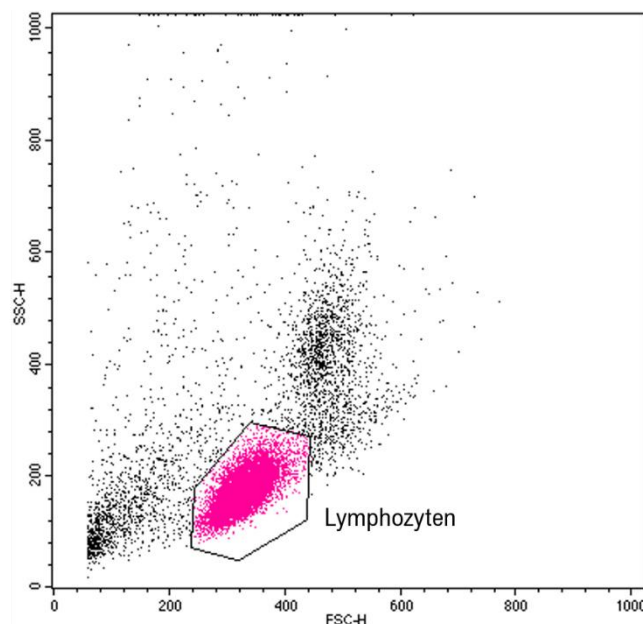


Abbildung 11: FSC/SSC-Dot-Plot mit Lymphozyten-Gate

Population rechts oberhalb der Lymphozyten: Monozyten; Diffuse Population am linken unteren Bildrand: Zelltrümmer

Quelle: Eigene Abbildung

Im Anschluss an das Auswählen des Gates musste sichergestellt werden, dass die ungefärbten Zellen in einem FL2/FL1-Dot-Plot beziehungsweise FL3/FL2-Dot-Plot im linken unteren Quadranten erscheinen. In diesen Dot-Plots werden die Zellen je nach

ihrer Farbintensität dargestellt und der linke untere Quadrant bedeutet, dass sie weder FL1, also FITC positiv, noch FL2 (PE) positiv oder FL3 (PE/Cy5) positiv sind. Diese Einstellung erfolgte über die Adjustierung der Spannung der Fluoreszenzdetektoren. In Abbildung 12 ist eine ungefärbte Lymphozyten-Population in einem FL2/FL1-Dot-Plot bzw. FL3/FL2-Dot-Plot zu sehen.

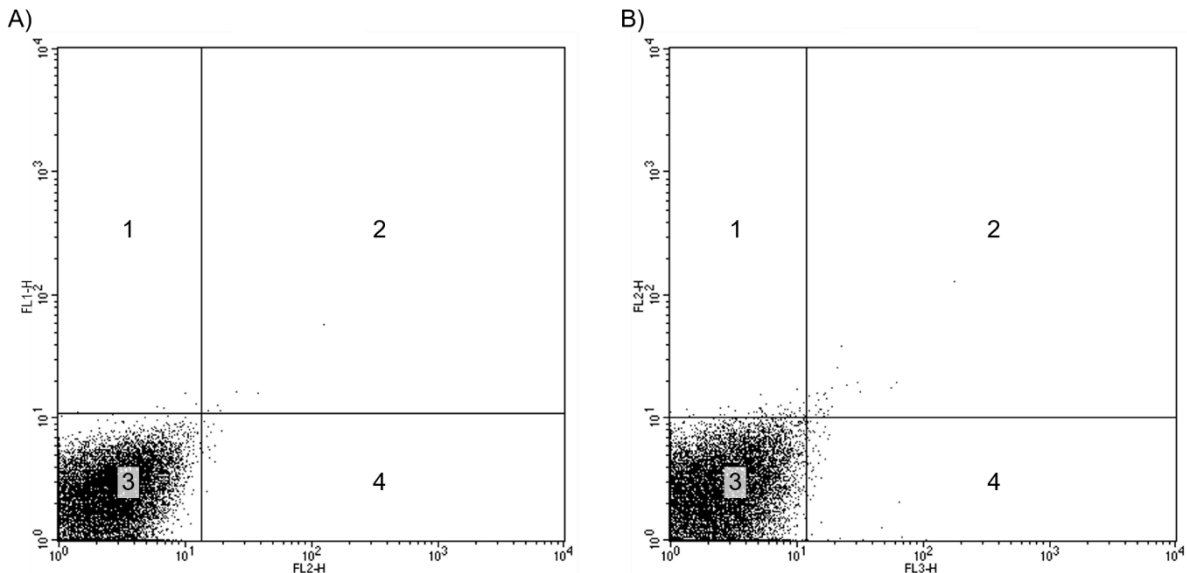


Abbildung 12: Ungefärbte Proben

(A) FL2/FL1-Dot-Plot - Quadrant 1: FL1 (FITC) positiv; Quadrant 2: FL1 (FITC) und FL2 (PE) positiv; Quadrant 3: FL1 (FITC) und FL2 (PE) negativ; Quadrant 4: FL2 (PE) positiv  
 (B) FL3/FL2-Dot-Plot - Quadrant 1: FL2 (PE) positiv; Quadrant 2: FL2 (PE) und FL3 (PE/Cy5) positiv; Quadrant 3: FL2 (PE) und FL3 (PE/Cy5) negativ; Quadrant 4: FL3 (PE/Cy5) positiv

Quelle: Eigene Abbildung

Die Einstellungen bezüglich der Spannung und Verstärkung der Detektoren blieben für die Messungen aller Patienten und Probanden unverändert, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Diese sind in Abbildung 13 dargestellt.

Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Lin
P2	SSC	398	1.00	Lin
P3	FL1	640	1.00	Log
P4	FL2	597	1.00	Log
P5	FL3	757	1.00	Log

Abbildung 13: Einstellungen der Spannung und Verstärkung der verschiedenen Detektoren

Quelle: Eigene Abbildung

Im nächsten Schritt mussten die Fluoreszenzfarbstoffe gegeneinander kompensiert werden. Da sich die Emissionswellenlängenbereiche sowohl von FITC und PE als auch

von PE und PE/Cy5 überlappen, strahlen die Fluoreszenzen auch in den jeweils anderen Kanal und werden dort als positives Signal detektiert. Um falsch positive Ergebnisse zu verhindern, muss der Anteil des Fluoreszenzsignals, der fälschlicherweise in den Kanal strahlt vom richtigen Signal abgezogen werden. Dazu wurde jede einfach gefärbte Probe einzeln gemessen und so kompensiert, dass die positiven Zellen auf Höhe der ungefärbten Zellen angezeigt wurden (78, S. 89 ff.). Die Dot-Plots der korrekt kompensierten, einfach gefärbten Proben sind in Abbildung 14 A - D dargestellt.

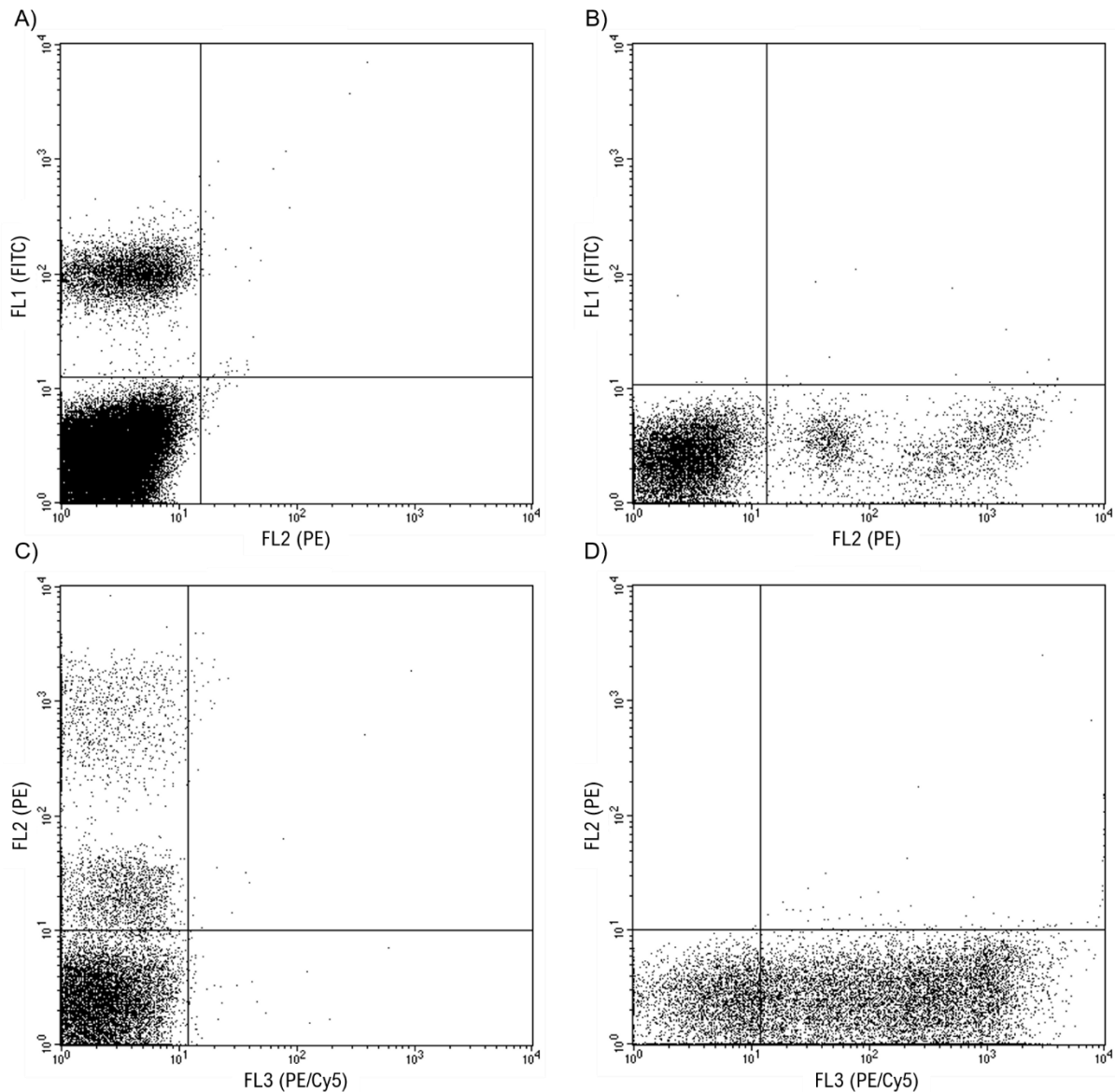


Abbildung 14: Kompensation einfach gefärbter Proben

- (A) FL2/FL1-Dot-Plot mit FITC-gefärbten Zellen (X-Achse: PE-Signal, Y-Achse: FITC-Signal)
- (B) FL2/FL1-Dot-Plot mit PE-gefärbten Zellen (X-Achse: PE-Signal, Y-Achse: FITC-Signal)
- (C) FL3/FL2-Dot-Plot mit PE-gefärbten Zellen (X-Achse: PE/Cy5-Signal, Y-Achse: PE-Signal)
- (D) FL3/FL2-Dot-Plot mit PECy5-gefärbten Zellen (X-Achse: PE/Cy5-Signal, Y-Achse: PE-Signal)

Quelle: Eigene Abbildung

Nach der Kompensation konnte die eigentliche Messung durchgeführt werden. Es wurden pro Probe dreimal 10 000 CD19 positive (CD19<sup>+</sup>) Zellen gemessen. Daraus konnte der Anteil der regulatorischen B-Zellen und der anderen B-Zell-Untergruppen an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup> Zellen) beziehungsweise an allen Lymphozyten (Zellen im Lymphozyten-Gate) errechnet werden. Um pro Messung immer 10 000 CD19<sup>+</sup> Zellen zu erfassen, wurde in einem FSC/FL1-Dot-Plot ein Gate um die FITC-positive Population gelegt und die Messung automatisch gestoppt nachdem 10 000 Ereignisse in diesem Gate erfasst wurden (vgl. Abbildung 15).

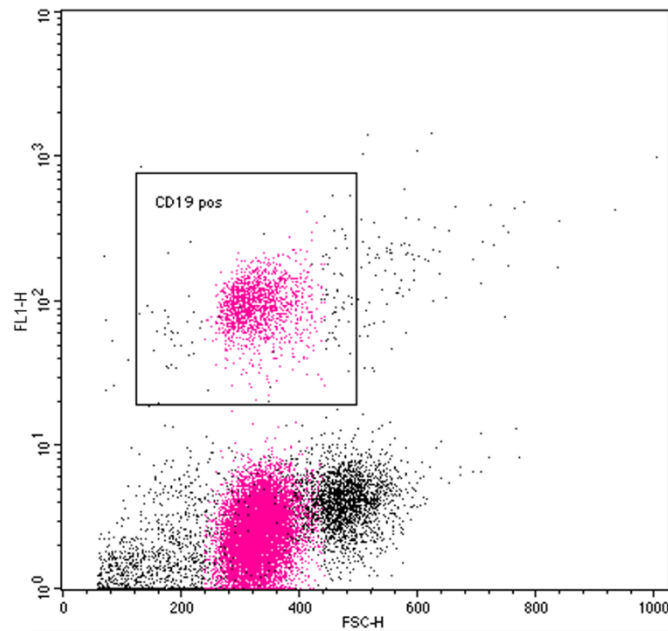


Abbildung 15: FSC/FL1-Dot-Plot mit Gate um CD19<sup>+</sup> Population

X-Achse: Forwardscatter (Größe der Zellen); Y-Achse: FL1 (FITC-Signal)

Populationen: FITC-positive Zellen (B-Zellen) befinden sich in der oberen Bildhälfte im „CD19 pos“-Gate und sind farblich hervorgehoben; farblich hervorgehobene Zellen in der unteren Bildhälfte sind CD19-negative Lymphozyten (insbesondere T-Zellen); bei der schwarz gefärbten Population rechts davon handelt es sich um Monozyten; diffuse Population in der linken unteren Bildhälfte: Zelltrümmer

Quelle: Eigene Abbildung

#### 3.2.6.4 Auswertung

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm BD CellQuest Pro. Um die Anzahl der regulatorischen B-Zellen zu bestimmen, wurden zunächst, wie in Abschnitt 3.2.6.3 beschrieben, die Lymphozyten (vgl. Abbildung 11) und im Anschluss die CD19<sup>+</sup> Zellen durch ein Gate herausgefiltert (vgl. Abbildung 15). Diese wurden dann in einem FL3/FL2-Dot-Plot dargestellt (vgl. Abbildung 16). Dort werden die Zellen nach der Intensität ihrer Fluoreszenz angeordnet. Auf der X-Achse (FL3-Kanal) werden die Zellen anhand der Stärke des PE/Cy5-Signals aufgetragen. Je stärker eine Zelle CD38 auf ihrer Oberfläche ausprägt, desto mehr antikörpergekoppelter PE/Cy5-

Fluoreszenzfarbstoff kann an ihr binden. Je mehr Farbstoff wiederum gebunden ist, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal und desto weiter rechts auf der X-Achse wird diese Zelle abgebildet (78, S, 96 ff.). Auf der Y-Achse werden in gleicher Weise die Zellen anhand der Stärke ihres PE-Fluoreszenzsignals aufgetragen. Der Farbstoff PE ist an einen anti-CD24-Antikörper gekoppelt, welcher das Oberflächenantigen CD24 auf der Zelloberfläche bindet. Je mehr CD24 eine Zelle ausprägt, desto stärker ist das PE-Fluoreszenzsignal und desto weiter oben auf der Y-Achse wird diese Zelle abgebildet (78, S, 96 ff.). Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, zeigten sich in diesem FL3/FL2-Dot-Plot verschiedene Zellpopulationen. Im rechten mittleren Bildbereich ist eine Population zu sehen, welche eine moderate Anfärbbarkeit mit PE sowie mit PE/Cy5 aufweist. Diese Zellen prägen CD24 und CD38 mittelstark auf ihrer Oberfläche aus und ihre Population wird als  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  (CD24 intermediate; CD38 intermediate) bezeichnet (38, 41). Links oberhalb dieser Population sind Zellen zu sehen, welche sich stärker mit PE anfärben lassen, allerdings wenig bis keine Anfärbbarkeit mit PE/Cy5 aufweisen. Sie prägen also sehr viel CD24 und wenig bis kein CD38 auf ihrer Oberfläche aus. Diese Population wird als  $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$  (CD24 high; CD38 negative) bezeichnet (38, 41). Die dritte abgrenzbare Population ist in der rechten oberen Ecke zu sehen und beinhaltet Zellen, die sowohl mit PE als auch mit PE/Cy5 sehr stark anfärbbar sind. Sie prägen also CD24 und CD38 sehr stark aus und werden  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  (CD24 high; CD38 high) genannt (38, 41).

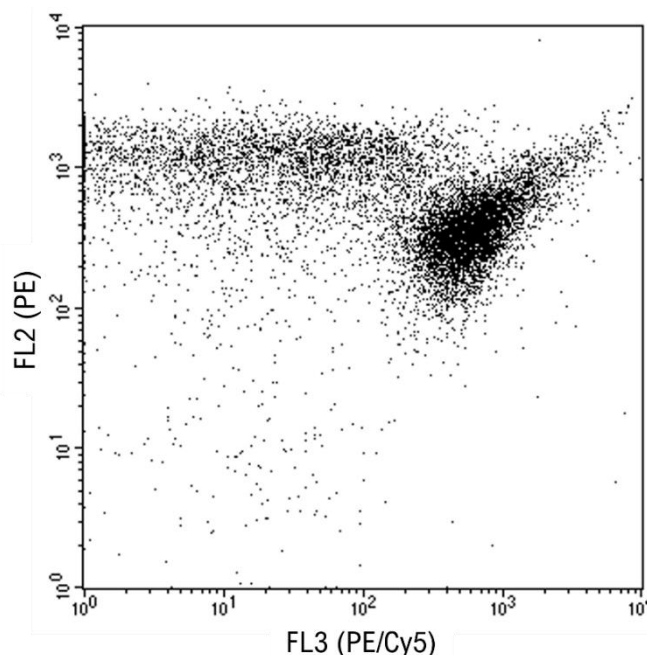


Abbildung 16: FL3/FL2-Dot-Plot mit dreifachgefärbten  $CD19^+$  Zellen

Darstellung von  $CD19^+$  gategeten Zellen, welche mit anti-CD38-PE/Cy5 und anti-CD24-PE gefärbt wurden.

X-Achse: FL3 - Zellen anhand der Ausprägung von CD38 auf ihrer Oberfläche angeordnet.

Y-Achse: FL2 - Zellen anhand der Ausprägung von CD24 auf ihrer Oberfläche angeordnet

Quelle: Eigene Abbildung

Nach Sanz et al. (38) konnten die verschiedenen Populationen spezifischen B-Zell-Untergruppen zugeordnet werden. Durch den Phänotyp  $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$  werden B-Gedächtniszellen charakterisiert. Der Phänotyp  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  definiert naive B-Zellen, worunter man reife B-Zellen versteht, welche noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatten (29, S. 396 ff., 38). Durch den Phänotyp  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  hingegen werden transitionale B-Zellen definiert (38). Innerhalb dieser Population finden sich regulatorische B-Zellen (49). Während aktuelle Studien Hinweise auf eine Vielzahl an unterschiedlichen immunsuppressiven B-Zell-Arten aufzeigen, sind die  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$   $B_{regs}$  eine gut untersuchte regulatorische B-Zell-Population (49). Sie hemmen die Immunantwort, indem sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch  $CD4^+$  T-Zellen inhibieren (41, 83). Außerdem unterdrücken sie die Differenzierung von naiven T-Zellen zu  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen und wandeln T-Zellen in regulatorische T-Zellen um (48).

Um die verschiedenen B-Zell-Untergruppen zu identifizieren, wurden bei jedem Patienten die Gates individuell verschoben. Dabei wurde der Abstand der Gates zueinander nicht verändert, es wurde lediglich deren Position auf der X- bzw. Y-Achse verschoben. Um die Gates korrekt zu setzen, wurde der oben gezeigte FL3/FL2-Dot-Plot (Abbildung 16) als Konturplot dargestellt (vgl. Abbildung 17A). Dadurch konnte nach Sanz et al. ein Gate um den Bereich der höchsten Dichte gelegt werden, welches den  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  Zellen entspricht (38). Zur Kontrolle der richtigen Position erfolgte außerdem eine Darstellung der Zellen als Dichteplot (vgl. Abbildung 17B). Dort wurden auch die weiteren Gates für die  $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$  und die  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  Zellen angezeigt, welche stets in Abhängigkeit des  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  -Gates gelegt wurden.

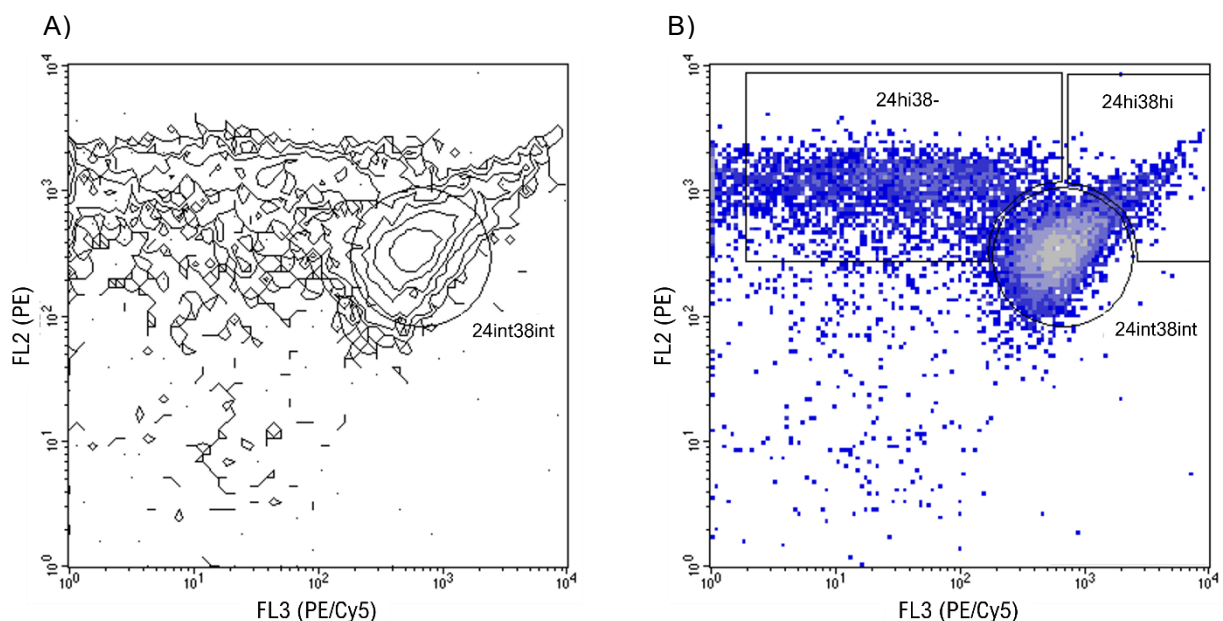


Abbildung 17: Kontur- und Dichteplot der dreifachgefärbten CD19<sup>+</sup> Zellen

(A) FL3/FL2-Konturplot mit Gate um Bereich höchster Dichte (entspricht  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  Zellen)



(B) FL3/FL2-Dichteplot mit gleichem Gate und zusätzlich den Gates für CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>-</sup> und CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Zellen

Quelle: Eigene Abbildung

Nachdem die drei Gates nach oben genanntem Schema gelegt wurden, wurde die jeweilige Probe wieder als FL3/FL2-Dot-Plot dargestellt. Ein exemplarischer FL3/FL2-Dot-Plot und die dazugehörige Gate-Statistik sind in Abbildung 18 dargestellt.

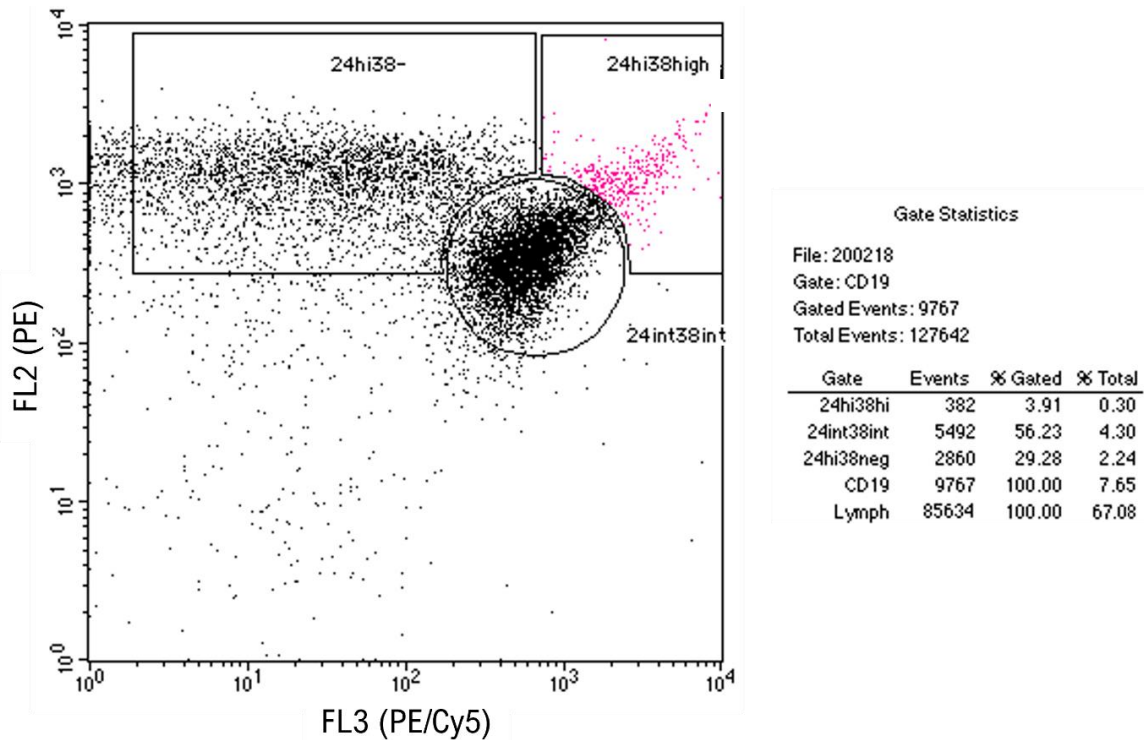


Abbildung 18: FL3/FL2-Dot-Plot mit Gates und zugehöriger Gate-Statistik zur Darstellung der B-Zell-Untergruppen

X-Achse: FL3; Y-Achse: FL2

Links: Darstellung eines exemplarischen FL3/FL2-Dot-Plots dreifachgefärbter CD19<sup>+</sup> Zellen mit Gates für CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup> (Naive B-Zellen), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>-</sup> (B-Gedächtniszellen) sowie der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> (regulatorische B-Zellen);

Rechts: Zugehörige Gate-Statistik zur Darstellung der absoluten Zellzahlen

Quelle: Eigene Abbildung

Mithilfe der Gate Statistik konnten die absoluten Anzahlen der gemessenen Lymphozyten, der B-Zellen (CD19<sup>+</sup> Zellen), der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup>, der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>-</sup> sowie der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> regulatorischen B-Zellen bestimmt werden. Aus den absoluten Anzahlen konnten die Anteile der einzelnen B-Zell-Subtypen und insbesondere der regulatorischen B-Zellen an den gesamten B-Zellen beziehungsweise an allen Lymphozyten errechnet werden.

### 3.2.7 In-Vitro-Stimulation von B-Zell-Subpopulationen

Ein Teil der isolierten mononukleären Zellen wurde zunächst zur Stimulation in Kultur genommen und danach weiteren Untersuchungen zugeführt. Wie in Abschnitt 2.3.3.2 beschrieben, entfalten die regulatorischen B-Zellen ihre immunsuppressive Wirkung vor allem durch die Ausschüttung von IL-10. Der Anteil der Zellen, welche IL-10 sezernieren, ist unter den CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitionalen B-Zellen besonders hoch. Absolut gesehen ist die IL-10-produzierende B-Zell-Population jedoch in nicht stimulierten Proben sehr klein (84). Um den Anteil an IL-10 produzierenden Zellen zu erhöhen, wurden die frisch isolierten PBMCs in einer Zellkultur mit verschiedenen Stoffen versetzt und so zur Differenzierung und Ausschüttung von IL-10 angeregt.

Als Protokoll für die Durchführung dieses Teils der Arbeit dienten verschiedene Veröffentlichungen folgender Arbeitsgruppen: Bankó et al. (71, 84), Daien et al. (85) und Marasco et al. (86). Von den isolierten und gezählten PBMCs aus Schritt 3.2.5 wurden  $2 \times 10^7$  Zellen entnommen. Die entnommene Zelllösung wurde bei  $300 \times g$  und  $20^\circ C$  für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert, sodass die Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  lebende Zellen pro Milliliter Medium vorlagen. Das Zellkulturmedium (Medium) bestand aus RPMI 1640 mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 1 % L-Alanyl-L-Glutamine, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Sodium Pyruvate und 10 mM/L HEPES und war auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Von der Zelllösung wurden zweimal je 5 ml entnommen und für zwei verschiedene Kulturansätze in die Vertiefungen einer 6-Well Mikrotiterplatte (well plate) gegeben. Ansatz 1 wurde mit 2,5 µg/ml CpG und 1 µg/ml CD40L versetzt. Ansatz 2 wurde mit 2 µg/ml Retinohomogenisat versetzt, welches zuvor selbst hergestellt wurde. Die Hintergründe und Vorbereitungen zu den verschiedenen Ansätzen sind unten unter Abschnitt 3.2.7.1 und 3.2.7.2 beschrieben. Die Zellen, welche als Suspensionskultur wachsen, wurden für 48 Stunden bei  $37^\circ C$  und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der zwei Tage wurden die Zelllösungen in 15 ml-Röhrchen überführt und für 10 min bei  $300 \times g$  zentrifugiert. Von beiden Zellkulturansätzen wurden je dreimal 1 ml Überstand abgenommen und bei  $-20^\circ C$  eingefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden zweimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Es wurde, wie in Punkt 3.2.5 beschrieben, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in Wasch-Puffer resuspendiert, so dass eine Konzentration von  $10^7$  Zellen pro Milliliter Puffer vorlag. Die Zellen aus beiden Kulturansätzen wurden, wie in Punkt 3.2.6.2 dargestellt, anhand ihrer Oberflächenmerkmale markiert und mit dem Durchflusszytometer gemessen. Die Messung mithilfe des Durchflusszytometers und die Auswertung erfolgten analog zu den in den Punkten 3.2.6.3 und 3.2.6.4 beschriebenen Schritten.

#### 3.2.7.1 Stimulation der Zellen mit CpG und CD40L

Um die B-Zellen zur Differenzierung in IL-10-produzierende regulatorische B-Zellen anzuregen, wurde das Zellkulturmedium mit den Stoffen CpG und CD40L versetzt. CpG ist ein Toll-like-Rezeptor-9-Ligand (TLR9-Ligand) und kann B-Zellen über den Toll-like-Rezeptor T-Zell-unabhängig aktivieren (44). Toll-like-Rezeptortypen sind sogenannte

Pattern-Recognition-Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen und dadurch verschiedene zelluläre Funktionen auslösen (28, S. 28 ff.). CD40L dagegen wird in vivo von T-Zellen exprimiert und kann durch Bindung an CD40 B-Zellen T-Zell-abhängig aktivieren. CD40, ausgeschrieben Cluster of Differentiation 40, ist ein membran-assoziiertes Protein der B-Zell-Oberfläche und gehört der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie an. Bindet der CD40-Ligand (CD40L) an CD40, wird die B-Zelle zu Wachstum, Reifung, Zytokin- und Antikörperproduktion angeregt (28, S. 308, 44). Ist das Signal durch die Bindung des Liganden allerdings verlängert und verstärkt, so kann dies einen hemmenden Einfluss auf die Ausschüttung von Antikörpern haben. Mehrere Studien identifizierten die Interaktion von CD40L und CD40 als essenziell für die Aktivierung von regulatorischen B-Zellen (44, 46, 87). Es wird angenommen, dass es in vivo zu einer optimalen IL-10-Produktion kommt, wenn eine durch den Toll-like-Rezeptor aktivierte B-Zelle ein stimulierendes Signal durch den CD40-Liganden einer T-Zelle bekommt (44). Die Anregung des Toll-like-Rezeptors wurde durch das CpG Oligonukleotid der Klasse B nachgebildet und das stimulatorische T-Zell-abhängige Signal durch Zugabe eines löslichen CD40-Liganden. Die als Feststoff gelieferten Stimulanzen wurden jeweils nach Herstellerangaben in sterilem, destilliertem Wasser beziehungsweise dem mitgelieferten endotoxinfreien Wasser aufgelöst, aliquotiert und bei - 20 °C aufbewahrt.

### 3.2.7.2 Stimulation der Zellen mit Retinahomogenisat

Neben der Stimulation, die eine optimale IL-10-Produktion erreichen sollte, wurden die Zellen auch mit einem Homogenisat aus Schweineretinae versetzt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es bei Ratten, die mit einem Homogenisat aus Sehnervenantigenen immunisiert wurden, zu einem signifikanten Verlust von retinalen Ganglienzellen kommt. Außerdem wurden bei diesen Tieren erhöhte autoreaktive Antikörper, die gegen Antigene der Retina, des Sehnervs und des Gehirns gerichtet waren, nachgewiesen. Zusätzlich zeigte sich in den Sehnerven der immunisierten Ratten eine Antikörper-Akkumulation, eine Aktivierung von Gliazellen sowie eine Demyelinisierung (88). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von Glaukompatienten in vitro anders auf retinale Antigene reagierten als solche von gesunden Vergleichspersonen (89). T-Zellen von Patienten zeigten in Anwesenheit eines Proteinlysats aus glaukomatöser Retina eine signifikant höhere Proliferationsrate als T-Zellen von Kontrollpersonen (89, 90). Daher sollte durch das Inkubieren mit Retinahomogenisat herausgefunden werden, ob auch B-Zellen von an Glaukom erkrankten Patienten anders auf einen Kontakt mit Retina-spezifischen Antigenen reagieren als solche von gesunden Probanden. Bei einem Homogenisat handelt es sich um feinst zerkleinertes Gewebe, in welchem die Zellorganellen der zerstörten Zellen frei vorliegen (91S. 45 ff.). Durch die im Folgenden beschriebenen Schritte konnte daraus ein konzentriertes Proteinlysat aus retinalen Zellen gewonnen werden.

Um das Retinahomogenisat herzustellen, wurden zunächst vier Netzhäute aus Schweineaugen isoliert. Die Augen stammten von einer lokalen Metzgerei, die die Schweine selbst schlachtet. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Retinae binnen drei Stunden nach der Schlachtung im Labor aufbereitet werden konnten. Die

Augen wurden zunächst mit 70 %igem Alkohol (EtOH) desinfiziert und dann unter sterilen Bedingungen präpariert. Als erster Schritt wurde der Augapfel entlang der Pars Plana des Ziliarkörpers mit Hilfe eines Skalpell aufgeschnitten und die Linse, die Iris, der Ziliarkörper und der Glaskörper entfernt. Nun konnte die Retina vorsichtig unter Verwendung eines Pinsels vom retinalen Pigmentepithel abgelöst werden. Mit einer feinen Schere wurde die Netzhaut an der Papilla nervi optici vom Sehnerv getrennt und in ein verschließbares 2 ml Reaktionsgefäß überführt. In gleicher Weise wurden auch die drei weiteren Retinae isoliert und in Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt. Zur Homogenisierung wurde das Precellys® Keramik-Kit 1,4/2,8 mm verwendet. Das Keramik-Gemisch und je 1,5 ml T-PER Puffer (Tissue Protein Extraction Reagent) wurde zu den gefrorenen Netzhäuten gegeben. Die Proben wurde mithilfe des Precellys® 24 Homogenisator bei 5000 rpm dreimal für je 45 Sekunden homogenisiert und im Anschluss bei 14 000 x g und 4 °C für 12 Minuten zentrifugiert. Um eine Verunreinigung der Proben mit unlöslichen Zelltrümmern zu vermeiden, wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt (92). Die so gewonnenen Überstände enthielten die, in T-PER Puffer gelösten, Proteine der jeweiligen Netzhäute. Für die weiteren Schritte wurde der Puffer durch Ultrafiltration mithilfe der Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit ausgetauscht und durch PBS ersetzt. Der Pufferaustausch erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Filtereinheit. Dazu wurden je 500 µl des Überstands in das Reservoir der Filtereinheit gegeben und diese bei 18 000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Dadurch blieb das gewonnene Protein oberhalb des Filters zurück, während der Puffer die Membran passieren konnte und sich unterhalb als Filtrat sammelte. Nach der Zentrifugation wurde das Filtrat verworfen und weitere 450 µl des Überstands in das Reservoir der Filtereinheit gegeben. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, bis die kompletten Überstände filtriert waren. Im Anschluss folgte nach derselben Vorgehensweise ein Waschschritt mit PBS. Zur Gewinnung des konzentrierten Proteins wurde in ein neues Reaktionsgefäß 200 µl PBS vorgelegt, die Filtereinheit mit der Oberseite nach unten in dem Gefäß platziert und dieses bei 5000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die konzentrierten Proteinlysate wurden gepoolt und es wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dabei wurde der Proteinlysatepool in einem Verhältnis von 1:20, 1:30 und 1:40 mit PBS verdünnt, um drei verschiedene Konzentrationsstufen zu erhalten. Die verschieden verdünnten Ansätze wurden jeweils dreimal mit dem Photometer Multiskan Ascent bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen (91, S. 2 ff., 92). Das konzentrierte Lysat wurde mit PBS verdünnt, so dass das Protein in einer Konzentration von 1 µg/ml vorlag. Daraus wurden Aliquots zu je 50 µg entnommen und diese bei - 20 °C aufbewahrt. Um die optimale Konzentration für die Stimulation der regulatorischen B-Zellen herauszufinden, wurden mehrere Kulturansätze mit unterschiedlichen Mengen des Retinahomogenisats versetzt und die durchflusszytometrischen Messergebnisse verglichen. Dabei konnte die höchste Anzahl an regulatorischen B-Zellen nach einer Stimulation mit 2 µg pro Milliliter Zellkulturmedium, in welchem 2 x 10<sup>6</sup> Zellen gelöst waren, nachgewiesen werden. Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren

Konzentrationen des Retinahomogenisats war die Anzahl der regulatorischen B-Zellen geringer.

### 3.2.8 Microarray

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin, die Level verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine der Patienten und Probanden zu erheben und auf eventuelle Unterschiede hin zu untersuchen. Dies wurde mithilfe eines Antikörper-Microarrays durchgeführt. Dieser dient dazu, eine Vielzahl von verschiedenen Antigenen in einer Probe zeitgleich zu detektieren und zu quantifizieren (78, S. 46 ff.). Untersucht wurden pro Studienteilnehmer eine Serumprobe sowie jeweils der Überstand aus den beiden Zellkulturansätzen. Die Serumprobe wurde wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben aus dem frisch abgenommenen Blut gewonnen und dann bei - 20 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren. Die Überstände aus den Zellkulturen, welche mit CpG und CD40L bzw. mit Retinahomogenisat stimuliert worden waren, wurden wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben entnommen und ebenfalls bei - 20 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren.

#### 3.2.8.1 Spotten

Für den Antikörper-Microarray wurde eine Reihe von Antikörpern, welche gegen pro- und antiinflammatorische Zytokine gerichtet sind, ausgewählt. Eine Übersicht über alle verwendeten Antikörper ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die Antikörper wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS verdünnt, sodass sie in einer Konzentration von 0,1 mg/ml vorlagen. Zu den verdünnten Antikörpern wurde im Verhältnis 1:1 Spotting Puffer zugegeben, welcher aus PBS mit 0,01 % Tween-20 und 0,5 % Glycerol bestand und auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt war. Als letzten Schritt der Vorbereitung wurden die Antikörper bei 800 x g und 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert.

Tabelle 3: Übersicht über die für das Spotten verwendeten Antikörper

Antikörper			
Anti-CCL2	Anti-CTGF	Anti-CXCL8	Anti-CYR61
Anti-EGF	Anti-HMGB1	Anti-IL-1A	Anti-IL-4
Anti-IL-6	Anti-IL-8	Anti-IL-10	Anti-IL-13
Anti-IL-18	Anti-IL-33	Anti-Interferon- $\gamma$	Anti-PLA2G5
Anti-PLA2G7	Anti-RANTES	Anti-TGFB1	Anti-TGFB2
Anti-TNF alpha	Anti-VEGFA		

Quelle: Eigene Darstellung

Die Antikörper-Microarrays wurden in unserem Labor mithilfe eines kontaktlosen Array-Spotters der Firma Scienion hergestellt. Das Spotten wurde von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und die fertiggestellten Objektträger wurden dieser Studie

zur Verfügung gestellt. Die vorbereiteten Antikörper wurden in Triplikaten auf Nitrocellulose-Objektträger gespottet. Als negative Kontrolle wurden Spots aus PBS miteingefügt. Während des Spottens war die Feuchtigkeit in der Klimakammer des Array-Spotters auf 60 % und die Temperatur auf 8 °C eingestellt. Um eine optimale Immobilisation der Proteine auf den Nitrocellulose-Objektträgern zu erreichen, wurden diese nach dem Spotten nicht bewegt, sondern zum Trocknen über Nacht liegen gelassen. Die getrockneten Objektträger wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.2.8.2 Labeln

Bevor die Proben mit einem Fluorochrom konjugiert werden konnten, musste die Proteinmenge der jeweiligen Probe bestimmt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt werden. Die Proteinbestimmung wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher nach Herstellerangaben durchgeführt. Da die ungefähr zu erwartende Proteinmenge bei Serumproben laborintern bereits bekannt ist, wurden diese in einem Verhältnis von 1:100 mit PBS verdünnt. Um vor der eigentlichen Messung die korrekte Verdünnung der Überstand-Proben zu ermitteln, wurden von drei zufällig ausgewählten Patienten jeweils die Überstände des CpG/CD40L-Zellkulturansatzes und des Retinahomogenisat-Zellkulturansatzes probehalber gemessen. Dazu wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:10, 1:50 und 1:100 mit PBS verdünnt, um drei verschiedene Konzentrationsstufen zu erhalten. Die Versuchsansätze mit einer Verdünnung von 1:50 und 1:100 wiesen eine zu geringe Proteinkonzentration auf und die Absorptionswerte lagen somit außerhalb des Absorptionsbereichs der Standardgeraden. Da die Absorptionswerte bei der Verdünnung von 1:10 am oberen Ende des Absorptionsbereichs der Standardgeraden lagen, wurde für die eigentliche Messung eine Verdünnung von 1:20 festgelegt. Die Serum- und Überstand-Proben aller Studienteilnehmer wurden zur Proteinbestimmung nach Herstellerangaben gefärbt und im Anschluss mit dem Photometer Multiskan Ascent der Firma Thermo Fisher Scientific bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen (91, S. 2 ff.). Die Messergebnisse wurden mithilfe der Ascent™ Software 2.6 erfasst und in Excel anhand der Standardgeraden ausgewertet. Die Proben wurden je nach ihrer Proteinkonzentration mit Labelling-Puffer verdünnt, sodass sie in einer Konzentration von 1 µg/µl vorlagen. Der Labelling-Puffer bestand aus vollentsalztem Wasser mit 0,05 M Natriumtetraborat Decahydrat und war auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt.

Von den verdünnten Serum-Proben wurden jeweils 100 µl in eine Vertiefung einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Außerdem wurde eine Serum-Referenzprobe vorbereitet. Diese bestand zu gleichen Teilen aus allen verdünnten Serumproben. Von der Serum-Referenzprobe wurden zehnmal 100 µl entnommen und ebenfalls je in eine Vertiefung der 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Da, wie in Punkt 4.2.1 beschrieben, der Effekt bei der Messung der Serumproben gering war, wurden die Überstände aus den beiden Zellkulturansätzen als Poolproben gemessen. Dazu wurden die Überstände nach der jeweiligen Stimulation der Zellkultur sowie nach Patienten und Probanden aufgeteilt. Aus den Überständen der mit CpG/CD40L stimulierten Zellkulturen wurde eine

Poolprobe von allen Patienten und eine von allen gesunden Probanden vorbereitet. Dazu wurde von jeder verdünnten Probe eines Patienten, welche mit CpG/CD40L stimuliert worden war, 10 µl entnommen und in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Ebenso wurde von jeder Probe eines gesunden Probanden, welche mit CpG/CD40L stimuliert worden war, 10 µl entnommen und in einem weiteren Eppendorfgefäß gesammelt. In gleicher Weise wurden auch zwei Poolproben aus den Überständen der mit Retinahomogenisat stimulierten Zellkulturansätze vorbereitet. Somit ergaben sich vier Poolproben: 1) CpG/CD40L Patient; 2) CpG/CD40L Proband; 3) Retinahomogenisat Patient; 4) Retinahomogenisat Proband. Von jeder Überstand-Poolprobe wurden 100 µl in eine Vertiefung der 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Auch für die Überstände wurde eine Referenzprobe erstellt. Diese bestand zu gleichen Teilen aus allen verdünnten Überstand-Proben. Von dieser Überstand-Referenzprobe wurden zwei Vertiefungen der 96-Well Mikrotiterplatte mit je 100 µl befüllt. Der letzte Schritt der Vorbereitung war es, zwei Negativkontrollen anzusetzen. Dazu wurden zweimal 100 µl Labelling-Puffer in je eine Vertiefung der 96-Well Mikrotiterplatte gegeben.

Im Anschluss konnte das eigentliche Färben (Labeln) durchgeführt werden. Dafür wurden zwei verschiedene Farbstoffe verwendet. Beide Farbstoffe binden über NHS-Ester-Chemie an die Aminogruppen der im Serum beziehungsweise Überstand befindlichen Proteine und können aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden (78, S. 46 ff.). Der erste Farbstoff war DyLight™ 650, welcher bei Anregung ein rotes Licht emittiert. Dieser wurde für die Markierung der regulären Proben, also aller Serumproben und der Überstand-Poolproben, verwendet. Außerdem wurde eine der beiden Negativkontrollen damit versetzt. Zum Färben der Proben wurde in jedes der genannten Wells 1 µl DyLight™ 650 zugegeben. Der zweite Farbstoff war DyLight™ 550. Dieser emittiert bei Anregung grünes Licht und wurde zur Markierung der Referenzproben verwendet. Die Serum-Referenzprobe, die Überstand-Referenzprobe sowie die zweite Negativkontrolle wurden mit je 1 µl DyLight™ 550 pro Well versetzt. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde jedem Well 10 µl Quenching Solution zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Diese bestand aus HPLC Wasser mit 1,5 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und war auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt. Die Proben wurden weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Im Anschluss wurde ungebundener Farbstoff mithilfe von Zeba Entsalzungs-Zentrifugationsplatten der Firma Thermo Scientific™ entfernt. Die Vertiefungen dieser Platten enthalten ein Harz, wodurch Salz und kleine Moleküle aus Proben entfernt werden können (93). Dazu wurde im ersten Schritt von der auf Raumtemperatur erwärmten Platte die Schutzfolien abgezogen und diese auf einer Waschplatte platziert. Die aufeinander gestellten Platten wurden bei 1000 x g für 2 Minuten zentrifugiert, um den Storage Buffer zu entfernen. Dieser sammelte sich durch die Zentrifugation in der Waschplatte und wurde verworfen. In jede Vertiefung der Entsalzungs-Zentrifugationsplatte wurden 250 µl PBS gegeben und die beiden Platten wurden erneut bei 1000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Der in der Waschplatte gesammelte Puffer wurde abermals verworfen und der Waschschritt wurde wiederholt. Im Anschluss

wurde in jede Vertiefung 100 µl PBS gegeben, die Platte wurde bei 1000 x g für 2 Minuten zentrifugiert und der gesammelte Puffer wurde verworfen. Die Entsalzungs-Zentrifugationsplatte wurde nun statt auf die Waschplatte auf einer Probensammelplatte platziert. Die Proben wurden in die Vertiefungen der Entsalzungs-Zentrifugationsplatte gegeben und die Platten wurden bei 1000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Dadurch sammelten sich die von ungebundenem Farbstoff gereinigten Proben in der Probensammelplatte. Diese wurde verschlossen und konnte bei - 20 °C vor Licht geschützt bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

### 3.2.8.3 Inkubation

Die Nitrocellulose-Objektträger aus Punkt 3.2.8.1 mussten für die Inkubation mit den Proben vorbereitet werden. Dazu wurde jeder Objektträger in einer Inkubationskammer befestigt, wodurch der Objektträger in 16 Abschnitte beziehungsweise Vertiefungen unterteilt wurde. Um Hintergrundsignale zu minimieren, wurde in jede Vertiefung 100 µl Blocking Buffer SuperG™ der Firma Grace Bio-Labs gegeben. Die Objektträger wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer (10 %) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Blocking Buffer abgenommen und es folgten drei Waschschriffe mit PBST (PBS mit 0,5 % Tween-20). Diese bestanden jeweils aus der Abnahme des Puffers, Zugabe von 100 µl PBST, zehnmalem Auf- und Abpipettieren und einer 10-minütigen Inkubation auf dem Thermomixer. Nach dem dritten Waschschriff waren die Objektträger bereit für die Inkubation mit den Proben. Alle folgenden Arbeits- sowie Inkubationsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Wie weiter oben beschrieben, war jeder Objektträger durch die Inkubationskammer in 16 verschiedene Abschnitte unterteilt und bot somit Platz für 16 Arrays. Auf jedem Objektträger musste zwingend eine Kontrolle mit PBS und eine mit den vorbereiteten Negativkontrollen aus Punkt 3.2.8.2 vorhanden sein. Dazu wurde eine Vertiefung jedes Objektträgers mit 100 µl PBS gefüllt. Eine zweite Vertiefung wurde mit 25 µl der DyLight™ 650 Negativkontrolle, mit 25 µl der DyLight™ 550 Negativkontrolle und mit 50 µl PBS gefüllt. Als drittes musste jeder Objektträger eine zu den Proben gehörige Referenzprobe enthalten. Somit wurde auf jedem Objektträger, auf dem Serumproben gemessen wurden, eine Vertiefung mit der Serum-Referenzprobe gefüllt und auf dem Objektträger, auf welchem die Überstand-Poolproben gemessen wurden, eine Vertiefung mit der Überstand-Referenzprobe. Dabei wurden jeweils 25 µl der Referenzproben mit 75 µl PBS vermischt und in eine Vertiefung gegeben. Die restlichen Vertiefungen wurden mit den Serumproben beziehungsweise den Überstand-Poolproben gefüllt. Dabei wurde in jede Vertiefung 25 µl der entsprechenden Probe gegeben und mit 25 µl der zugehörigen Referenzprobe sowie 50 µl PBS gemischt. Die Objektträger wurden im Anschluss für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer (10 %) mit den Proben inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgten vier, wie weiter oben beschriebene, Waschschriffe. Die ersten zwei erfolgten mit PBST, für die letzten zwei wurde ultrareines Wasser (HPLC grade) verwendet. Nach dem letzten Waschschriff wurde das HPLC Wasser abgenommen und die Objektträger aus den Inkubationskammern entnommen. Die Objektträger wurden mithilfe einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C getrocknet und unmittelbar im Anschluss gemessen.



#### 3.2.8.4 Messung, Quantifizierung und Datenanalyse

Die Messung sowie die Quantifizierung und Datenanalyse wurde durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Antikörper-Microarrays wurden mithilfe des Microarray-Scanners SensoSpot® der Firma Miltenyi Imaging gemessen und als 16-Bit-TIFF-Dateien digitalisiert. Dabei wurde sowohl die Intensität des roten Lichts, welches durch den Farbstoff DyLight™ 650 emittiert wird, als auch die des grünen Lichts, welches durch den Farbstoff DyLight™ 550 emittiert wird, gemessen. Für die Quantifizierung und Datenanalyse wurde die Analysesoftware ImaGene™ 5.5 von BioDiscovery verwendet. Mithilfe dieser Software konnten die Intensitäten der verschiedenen Spots quantifiziert werden. Spots, welche eine schlechte Qualität aufwiesen, wurden manuell kontrolliert und von späteren Analysen ausgeschlossen. Die absoluten Intensitäten der Spots wurde errechnet, indem das lokale Hintergrundsignal abgezogen wurde. Ergab sich dadurch ein negatives Ergebnis, wurden diese Spots als fehlend behandelt. Im nächsten Schritt wurde von jeder errechneten Intensität der Wert der Negativkontrolle, welche auf jedem Objektträger mitgemessen wurde, abgezogen. Mithilfe des Programms Statistica® 13 der Firma Statsoft wurden aus den gespotteten Triplikaten die Mittelwerte der Intensitäten gebildet. Zur Normalisierung wurde der Quotient aus der Intensität des roten Lichts und der des grünen Lichts errechnet. Mit den so erhaltenen normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten wurden alle weiteren Berechnungen durchgeführt. Die normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten waren proportional zur Konzentration des jeweils untersuchten Zytokins.

### 3.2.9 Statistik

#### 3.2.9.1 Durchflusszytometrie

Zur statistischen Auswertung der Messergebnisse der Durchflusszytometrie wurde das Programm Statistica® 13 der Firma Statsoft genutzt. Um statistisch signifikante Unterschiede in den Frequenzen der B-Zell-Subgruppen sowie insbesondere der regulatorischen B-Zellen zwischen Patienten und Probanden zu ermitteln, wurde der Student's *t*-Test berechnet. Die absoluten Anzahlen wurden jeweils aus der, wie in Punkt 3.2.6.4 beschrieben, zugehörigen Gate Statistik entnommen. Als statistisch signifikant wurde ein *p*-Wert von  $\leq 0,05$  angesehen.

#### 3.2.9.2 Microarray

Zur statistischen Auswertung der Microarray-Messergebnisse wurde ebenfalls das Programm Statistica® 13 der Firma Statsoft genutzt. Für alle Berechnungen wurden die, wie in Punkt 3.2.8.4 genauer beschriebenen, normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten verwendet. Zur Detektion statistisch signifikanter Unterschiede der Zytokin-Level bei Patienten und Probanden wurde für die Untersuchung der Serumproben der Student's *t*-Test herangezogen. Dabei wurde ein *p*-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Für die Untersuchung der Überstand-Poolproben wurde ein Fold Change-Berechnung durchgeführt. Dabei wurden die normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten (nFI) der einzelnen Zytokine von Patienten und Probanden, aufgeteilt nach

Stimulation (C: Stimulation mit CpG/CD40L; R: Stimulation mit Retinahomogenisat), anhand folgender Formeln zueinander ins Verhältnis gesetzt:

$$Fold\ Change_{(C)} = \log_2 \left( \frac{nFI_{patient}}{nFI_{proband}} \right)$$

$$Fold\ Change_{(R)} = \log_2 \left( \frac{nFI_{patient}}{nFI_{proband}} \right)$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Durchflusszytometrie

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse erfolgte, wie in Punkt 3.2.6.4 dargestellt, anhand verschiedener Gates und der jeweils zugehörigen Gate-Statistik. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die mononukleären Zellen des Blutes verwendet, die, wie in Punkt 3.2.4 beschrieben, aus dem Vollblut isoliert wurden. Die Anteile der verschiedenen Zellen innerhalb der PBMCs variieren interindividuell, aber bewegen sich innerhalb einer gewissen Bandbreite (94). Eine Übersicht über die physiologischen Anteile der mononukleären Zellen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Verteilung der peripheren mononukleären Zellen

PBMCs	Anteile
Lymphozyten	70 – 90 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>- T-Zellen (70 – 85 %)</li> <li>- B-Zellen (5 – 10 %)</li> <li>- NK-Zellen (5 – 20 %)</li> </ul>	
Monozyten	10 – 20 %
Dendritische Zellen	1 – 2 %

Quelle: Eigene Abbildung nach (94)

#### 4.1.1 Lymphozyten

Der Anteil von Lymphozyten an allen Events (PBMCs und Zelltrümmer) war bei Patienten ( $M = 59,28 \%$ ;  $SD = 14,38 \%$ ) niedriger als bei gesunden Probanden ( $M = 68,25 \%$ ;  $SD = 8,58 \%$ ). In nicht-stimulierten Proben ergab der  $t$ -Test, dass der Unterschied signifikant war ( $t(28) = -2,11$ ,  $p = 0,044$ ). Beim Vergleich der Proben nach Stimulation ließ sich keine Signifikanz nachweisen, aber die gleiche Tendenz. Eine grafische Darstellung der Ergebnisse der nicht-stimulierten Proben als Boxplot ist in Abbildung 19 zu sehen. Eine Übersicht über die statistischen Ergebnisse ist in Tabelle 5 dargestellt.

Der Anteil der Lymphozyten bei Gesunden mit annähernd 70 % passt zu den in der Literatur angegebenen Werten, wohingegen die Lymphozyten bei den Patienten im Vergleich erniedrigt sind. Die insgesamt etwas erniedrigten Anteile könnten durch die durchflusszytometrische Messung und die hier angewandte Definition der PBMCs als „alle Events“ erklärt werden. Da neben den zuvor isolierten PBMCs (siehe Abschnitt

3.2.4) auch Zelltrümmer in der Messung erfasst und als Events gezählt wurden (siehe Abbildung 11, Abschnitt 3.2.6.3), wurde fälschlicherweise eine zu hohe Gesamtzahl an PBMCs als Grundlage für die Berechnung herangezogen. Dies könnte in künftigen Studien durch Erhöhung des Thresholds, also des Schwellenwertes, welcher eingesetzt wird, um echte Events (Zellen) vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden, umgangen werden.

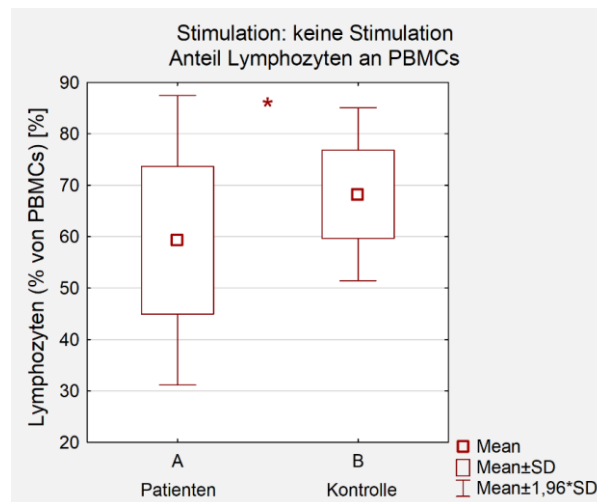


Abbildung 19: Anteil der Lymphozyten an allen PBMCs

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von Lymphozyten an allen Events (PBMCs) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Probanden (X-Achse) in nicht-stimulierten Proben. Bei Patienten ist der Mittelwert der Anteile von Lymphozyten an allen PBMCs signifikant niedriger als bei Kontrollen ( $p = 0,044$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

Tabelle 5: Anteil der Lymphozyten an PBMCs

Stimulation:	Nicht-stimuliert	CpG/CD40L	Retinahomogenisat
$M_{(Patienten)}$	59,28 %	58,35 %	58,81 %
$M_{(Kontrolle)}$	68,25 %	64,02 %	64,67 %
$SD_{(Patienten)}$	14,38 %	11,27 %	12,65 %
$SD_{(Kontrolle)}$	8,58 %	8,62 %	7,18 %
$t (28)$	- 2,11	- 1,56	- 1,58
$p$	0,044	0,130	0,124

Mithilfe des  $t$ -Tests wurden die Mittelwerte von Patienten ( $M_{(Patienten)}$ ) und Kontrollen ( $M_{(Kontrollen)}$ ) verglichen, jeweils aufgeteilt nach der Stimulation (Nicht-stimuliert, CpG/CD40L, Retinahomogenisat).  $M$ : Mittelwert,  $SD$ : Standardabweichung,  $t$ : T-Wert,  $p$ : p-Wert

Quelle: Eigene Abbildung

#### 4.1.2 B-Zellen

Der Anteil der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) an allen Lymphozyten lag in den nicht-stimulierten Proben im Durchschnitt bei 8,8 % und entspricht damit dem erwarteten Bereich (siehe Tabelle 4). Nach den Stimulationen sank der Anteil jeweils um wenige Prozentpunkte, aber lag weiterhin im Referenzbereich. Zwischen Patienten und Kontrollpersonen konnte kein statistisch relevanter Unterschied festgestellt werden. Eine Übersicht über die statistischen Ergebnisse ist in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Anteil der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) an allen Lymphozyten

Stimulation:	Nicht-stimuliert	CpG/CD40L	Retinahomogenisat
$M_{(Patienten)}$	9,38 %	6,51 %	5,60 %
$M_{(Kontrolle)}$	8,22 %	5,85 %	5,12 %
$SD_{(Patienten)}$	4,42 %	3,78 %	2,43 %
$SD_{(Kontrolle)}$	3,40 %	2,43 %	1,79 %
$t$ (28)	0,81	0,57	0,61
$p$	0,42	0,57	0,55

Mithilfe des  $t$ -Tests wurden die Mittelwerte von Patienten ( $M_{(Patienten)}$ ) und Kontrollen ( $M_{(Kontrollen)}$ ) verglichen, jeweils aufgeteilt nach der Stimulation (Nicht-stimuliert, CpG/CD40L, Retinahomogenisat).  $M$ : Mittelwert,  $SD$ : Standardabweichung,  $t$ : T-Wert,  $p$ : p-Wert

Quelle: Eigene Abbildung

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit CpG auf der einen Seite zu einem Anstieg der IL-10-produzierenden B<sub>regs</sub> führt, auf der anderen Seite aber zu einer Abnahme der CD19<sup>+</sup> B-Zellen. Es wurden eine erhöhte Differenzierung zu Plasmablasten (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) sowie eine steigende Mortalität der B-Zellen mit zunehmender Stimulationsdauer beschrieben (85, 86). Entsprechend der Literatur konnte, wie in Tabelle 6 ersichtlich, eine Abnahme der CD19<sup>+</sup> B-Zellen nach der Stimulation mit CpG/CD40L festgestellt werden ( $M_{(Patienten)}$  Nicht stimuliert = 9,38 % vs. CpG/CD40L = 6,51 %;  $M_{(Kontrolle)}$  Nicht stimuliert = 8,22 % vs. CpG/CD40L = 5,85 %).

##### 4.1.2.1 Regulatorische B-Zellen

Der Anteil der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> regulatorischen B-Zellen an allen CD19<sup>+</sup> B-Zellen war bei Gesunden tendenziell höher als bei Patienten. Der durchschnittliche Anteil der B<sub>regs</sub> lag in nicht-stimulierten Proben bei den Patienten bei 6,00 % mit einer Standardabweichung von 2,76 %. Bei gesunden Probanden lag dieser bei 7,43 % mit einer Standardabweichung von 3,98 %. Ein  $t$ -Test ergab, dass die Differenz der durchschnittlichen Anteile nicht signifikant war. Insbesondere nach der Stimulation mit Retinahomogenisat ließ sich jedoch ein tendenziell höherer Anteil der B<sub>regs</sub> bei Gesunden im Vergleich zu Erkrankten feststellen. Diese Tendenz ist in ähnlicher Form

sowohl in nicht-stimulierten als auch in mit CpG/CD40L stimulierten Proben zu erkennen. Exemplarisch ist das Ergebnis der Messung der, mit Retinahomogenisat stimulierten, Proben in Abbildung 20 als Boxplot dargestellt. Eine Übersicht über die statistischen Ergebnisse ist in Tabelle 7 zu sehen.

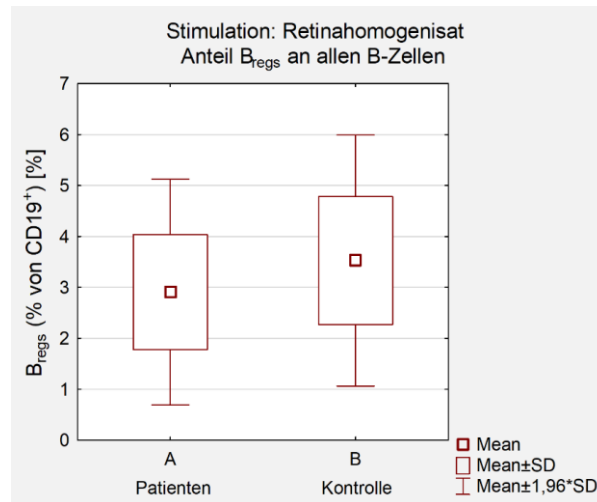


Abbildung 20: Anteil CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B<sub>regs</sub> an CD19<sup>+</sup> B-Zellen

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von B<sub>regs</sub> (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Kontrollen (X-Achse) in mit Retinahomogenisat stimulierten Proben. Bei Patienten ist der Mittelwert der Anteile von B<sub>regs</sub> an allen B-Zellen tendenziell niedriger als bei Kontrollen ( $p = 0,17$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

Tabelle 7: Anteil der regulatorischen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>)

Stimulation:	Nicht-stimuliert	CpG/CD40L	Retinahomogenisat
$M_{(Patienten)}$	6,00 %	8,00 %	2,91 %
$M_{(Kontrolle)}$	7,43 %	9,31 %	3,53 %
$SD_{(Patienten)}$	2,76 %	1,74 %	1,13 %
$SD_{(Kontrolle)}$	3,98 %	3,89 %	1,56 %
$t (28)$	- 1,13	- 1,15	- 1,41
$p$	0,27	0,26	0,17

Mithilfe des  $t$ -Tests wurden die Mittelwerte von Patienten ( $M_{(Patienten)}$ ) und Kontrollen ( $M_{(Kontrollen)}$ ) verglichen, jeweils aufgeteilt nach der Stimulation (Nicht-stimuliert, CpG/CD40L, Retinahomogenisat).  $M$ : Mittelwert,  $SD$ : Standardabweichung,  $t$ : T-Wert,  $p$ : p-Wert

Quelle: Eigene Abbildung

In der Literatur wurden für die  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  regulatorischen B-Zellen Anteile zwischen 2 % und 9 % an allen B-Zellen bei gesunden Personen beschrieben (38, 41, 85). Bei Patienten, die an Rheumatoider Arthritis leiden, konnte ein um ca. zwei Prozentpunkte erniedrigter Anteil im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (48, 85). Die hier bei gesunden Probanden gemessenen Werte (siehe Tabelle 7) entsprechen der Literatur ( $M_{(Kontrolle)}$ : Nicht stimuliert = 7,43 %; CpG/CD40L = 9,31 %; Retinahomogenisat = 3,53 %). Die Ergebnisse der erkrankten Gruppe (siehe Tabelle 7) gleichen den in der Literatur beschriebenen Werten für an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten ( $M_{(Patienten)}$ : Nicht stimuliert = 6,00 %; CpG/CD40L = 8,00 %; Retinahomogenisat = 2,91 %). Eine Einordnung dieser Ergebnisse findet sich weiter unten in Abschnitt 5.1.

Durch die Stimulation mit CpG und CD40L wird die Anzahl an IL-10-produzierenden regulatorischen B-Zellen erhöht (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.7.1) (44, 84). Auch in dieser Studie konnte ein Anstieg des Anteils der regulatorischen B-Zellen an allen B-Zellen durch die Stimulation mit CpG/CD40L festgestellt werden. Bei Patienten stieg der Anteil der regulatorischen B-Zellen durch die Stimulation mit CpG/CD40L signifikant an ( $M_{(Patienten)}$ : Nicht stimuliert = 6,00 %;  $SD = 2,76$  %;  $M_{(Patienten)}$ : CpG/CD40L = 8,00 %;  $SD = 1,74$  %;  $t(26) = -2,30$ ,  $p = 0,03$ ). Bei gesunden Probanden konnte ebenfalls ein Anstieg nachgewiesen werden, ein  $t$ -Test ergab allerdings keine Signifikanz ( $M_{(Kontrolle)}$ : Nicht stimuliert = 7,43 %;  $SD = 3,97$  %;  $M_{(Kontrolle)}$ : CpG/CD40L = 9,31 %;  $SD = 3,88$  %;  $t(30) = -1,35$ ,  $p = 0,19$ ). In Abbildung 21 ist dies grafisch dargestellt.

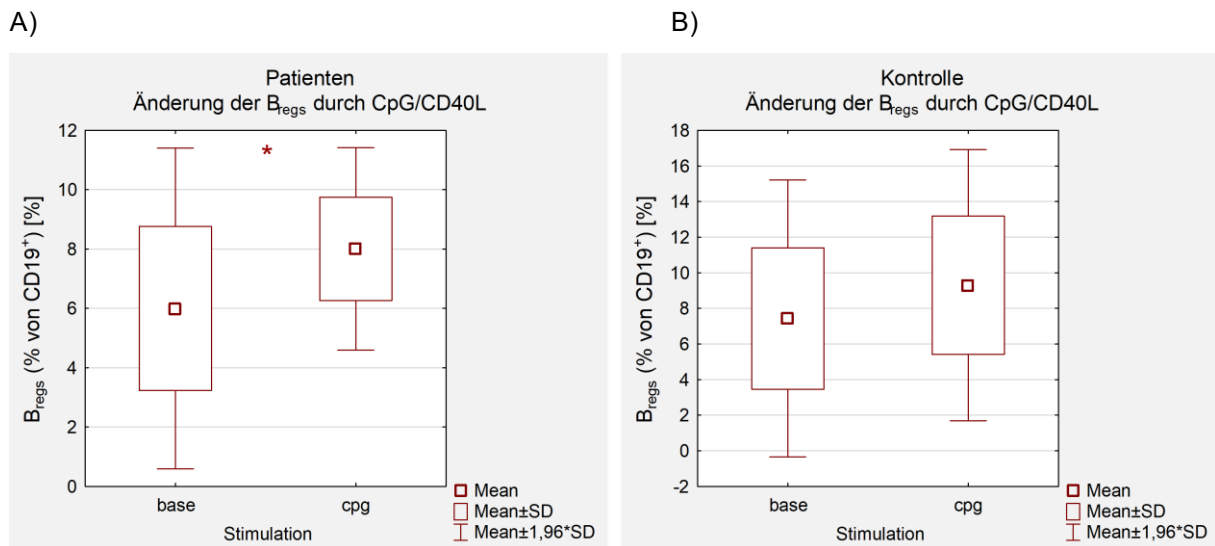


Abbildung 21: Änderung der  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  Bregs durch Stimulation mit CpG/CD40L

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von Bregs ( $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ ) an allen B-Zellen ( $CD19^+$ ) (Y-Achse; in Prozent) vor und nach der Stimulation mit CpG/CD40L (X-Achse) bei A) Patienten und B) Kontrollen. Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

Durch die Stimulation mit Retinahomogenisat sank der Anteil der  $B_{\text{regs}}$  an allen B-Zellen bei Patienten und Kontrollpersonen deutlich ab im Vergleich zu nicht-stimulierten Proben. Dies ist in Abbildung 22 grafisch dargestellt.

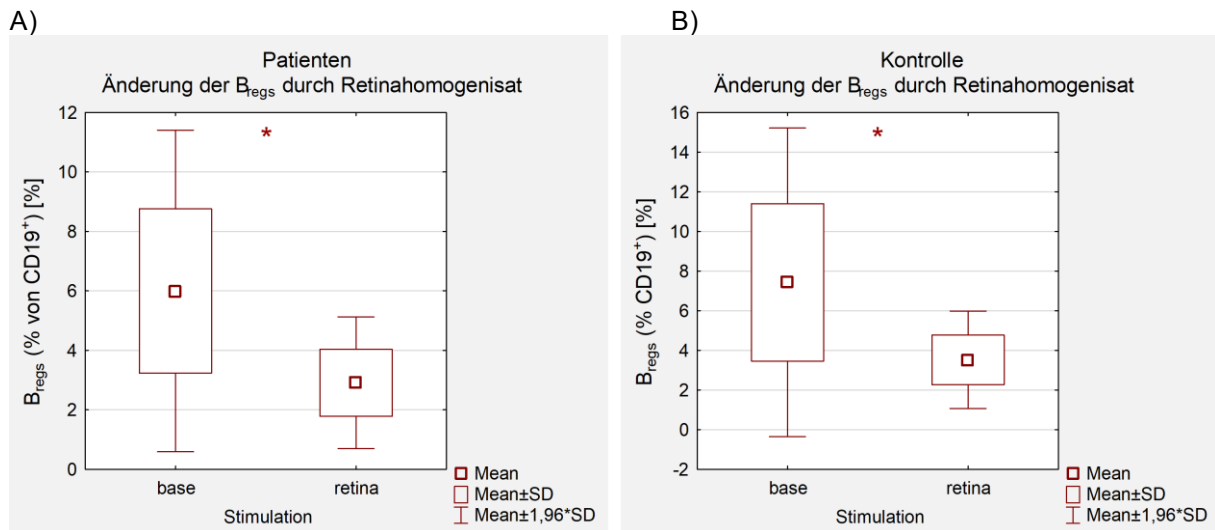


Abbildung 22: Änderung der  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$   $B_{\text{regs}}$  durch Stimulation mit Retinahomogenisat

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von  $B_{\text{regs}}$  (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) (Y-Achse; in Prozent) vor und nach der Stimulation mit Retinahomogenisat (X-Achse) bei A) Patienten und B) Kontrollen; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

#### 4.1.2.2 B-Gedächtniszellen

Der Anteil der B-Gedächtniszellen an allen B-Zellen ist bei Patienten tendenziell höher als bei Gesunden. Der durchschnittliche Anteil der  $B_{\text{mems}}$  lag in nicht-stimulierten Proben bei den Patienten bei 33,20 % mit einer Standardabweichung von 12,18 %. Bei gesunden Probanden lag dieser bei 25,77 % mit einer Standardabweichung von 18,66 %. Ein  $t$ -Test ergab, dass die Differenz der durchschnittlichen Anteile nicht signifikant war, aber es konnte, sowohl bei den nicht-stimulierten als auch bei den mit CpG/CD40L stimulierten Proben, eine tendenzielle Veränderung festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nach der Stimulation mit Retinahomogenisat. Ein  $t$ -Test ergab eine signifikante Differenz der durchschnittlichen Anteile der  $B_{\text{mems}}$  an allen B-Zellen zwischen Patienten und Probanden. Exemplarisch ist das Ergebnis der Messung der, mit Retinahomogenisat stimulierten, Proben in Abbildung 23 als Boxplot dargestellt. Eine Übersicht über die statistischen Ergebnisse ist in Tabelle 8 zu sehen.



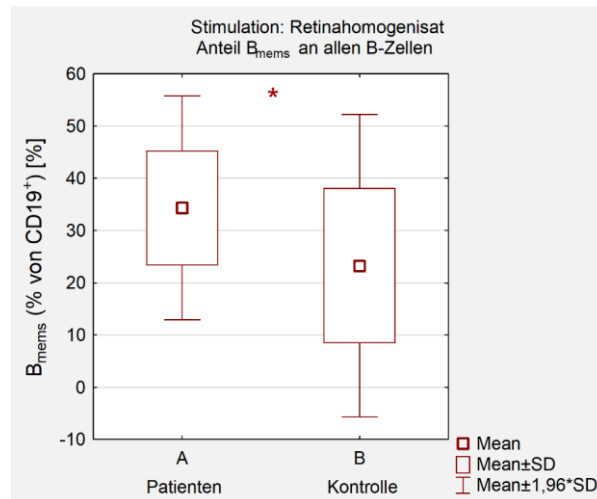


Abbildung 23: Anteil  $CD19^+CD24^{hi}CD38^- B_{\text{mems}}$  an  $CD19^+$  B-Zellen

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von  $B_{\text{mems}}$  ( $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$ ) an allen B-Zellen ( $CD19^+$ ) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Kontrollen (X-Achse) in mit Retinahomogenisat stimulierten Proben. Bei Patienten ist der Mittelwert der Anteile von  $B_{\text{mems}}$  an allen B-Zellen signifikant höher als bei Kontrollen ( $p = 0,03$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

Tabelle 8: Anteile von B-Gedächtniszellen ( $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$ ) an allen B-Zellen ( $CD19^+$ )

Stimulation:	Nicht-stimuliert	CpG/CD40L	Retinahomogenisat
$M_{(Patienten)}$	33,20 %	26,83 %	34,34 %
$M_{(Kontrolle)}$	25,77 %	19,85 %	23,26 %
$SD_{(Patienten)}$	12,18 %	12,74 %	10,94 %
$SD_{(Kontrolle)}$	18,66 %	15,10 %	14,79 %
$t$ (28)	1,27	- 1,36	2,30
$p$	0,21	0,19	0,03

Mithilfe des  $t$ -Tests wurden die Mittelwerte von Patienten ( $M_{(Patienten)}$ ) und Kontrollen ( $M_{(Kontrollen)}$ ) verglichen, jeweils aufgeteilt nach der Stimulation (Nicht-stimuliert, CpG/CD40L, Retinahomogenisat).  $M$ : Mittelwert,  $SD$ : Standardabweichung,  $t$ : T-Wert,  $p$ : p-Wert

Quelle: Eigene Abbildung

In der Literatur wurden für die B-Gedächtniszellen Anteile von ca. 20 % bis 32 % an allen B-Zellen bei gesunden Personen beschrieben (38, 41, 85, 95). Der hier festgestellte Anteil von 25,77 % in nicht-stimulierten Proben von gesunden Kontrollpersonen liegt somit im erwarteten Bereich (siehe Tabelle 8).

Wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, regt die Stimulation mit CpG/CD40L die B-Zellen zur Differenzierung zu Plasmablasten an. Dabei differenzieren vor allem die B-

Gedächtniszellen, so dass ihre Anzahl sich verringert (86). Auch in dieser Studie konnte eine Verringerung des Anteils der B-Gedächtniszellen an allen B-Zellen durch die Stimulation mit CpG/CD40L festgestellt werden. In Abbildung 24 ist dies grafisch dargestellt.

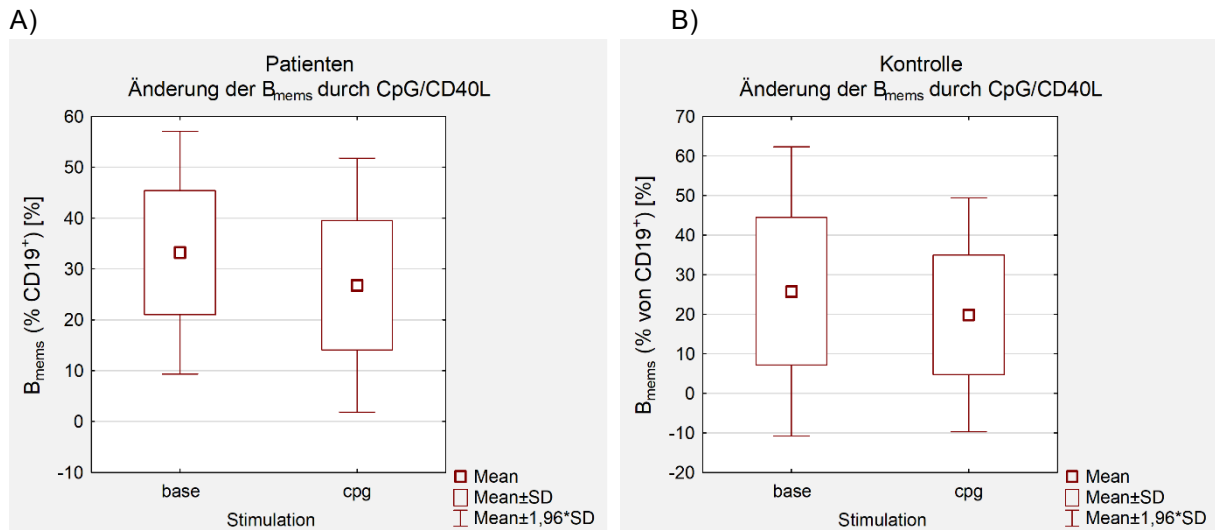


Abbildung 24: Änderung der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>-</sup> B<sub>mems</sub> durch Stimulation mit CpG/CD40L

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von B<sub>mems</sub> (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>-</sup>) an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) (Y-Achse; in Prozent) vor und nach der Stimulation mit CpG/CD40L (X-Achse) bei A) Patienten und B) Kontrollen; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

Der Anteil von B-Gedächtniszellen an allen B-Zellen stieg nach der Stimulation mit Retinahomogenisat bei Patienten leicht an, und sank bei gesunden Probanden im Vergleich zu den nicht-stimulierten Proben leicht ab. Dies ist in Abbildung 25 als Boxplot abgebildet.

Bei einer genaueren Betrachtung der Differenz der Anteile zwischen den nicht-stimulierten und den mit Retinahomogenisat stimulierten Proben zeigte sich, dass die Differenz bei Patienten durchschnittlich bei + 1,14 % mit einer Standardabweichung von 4,40 % und bei gesunden Probanden bei - 2,50 % mit einer Standardabweichung von 5,93 % lag. Ein *t*-Test ergab, dass die Differenz der durchschnittlichen Änderungen der Anteile zwischen Patienten und Probanden mit einem *p*-Wert von 0,07 fast signifikant war ( $t(28) = 1,89$ ). In Abbildung 26 sind die Änderungen der Anteile der B<sub>mems</sub> durch die Stimulation mit Retinahomogenisat grafisch dargestellt.

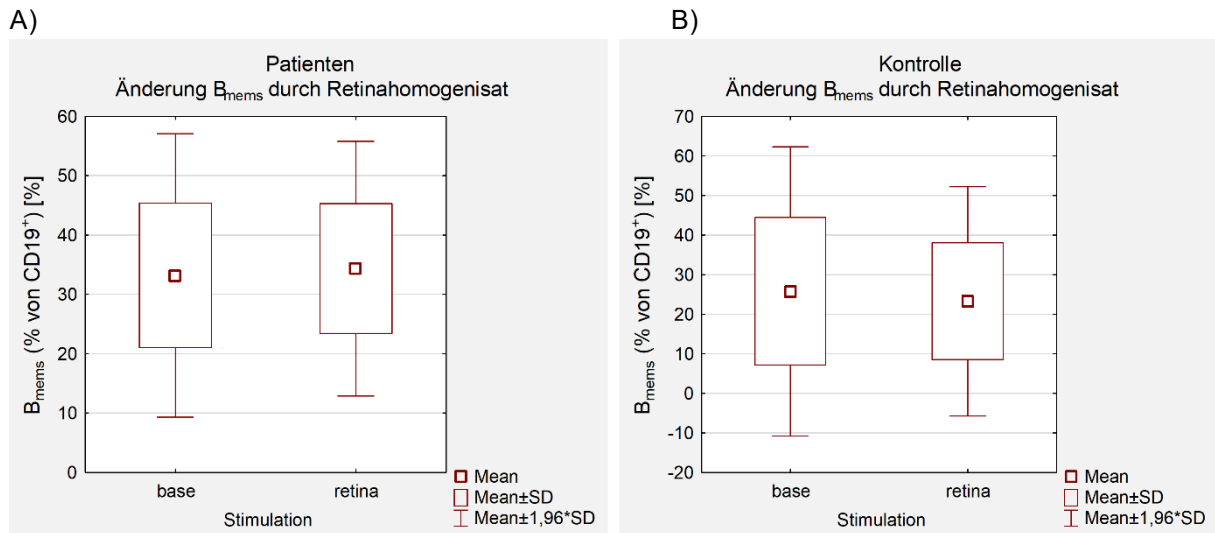


Abbildung 25: Änderung der  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^-$   $B_{\text{mems}}$  durch Stimulation mit Retinahomogenisat

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von  $B_{\text{mems}}$  ( $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^-$ ) an allen B-Zellen ( $CD19^+$ ) (Y-Achse; in Prozent) vor und nach der Stimulation mit Retinahomogenisat (X-Achse) bei A) Patienten und B) Kontrollen; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

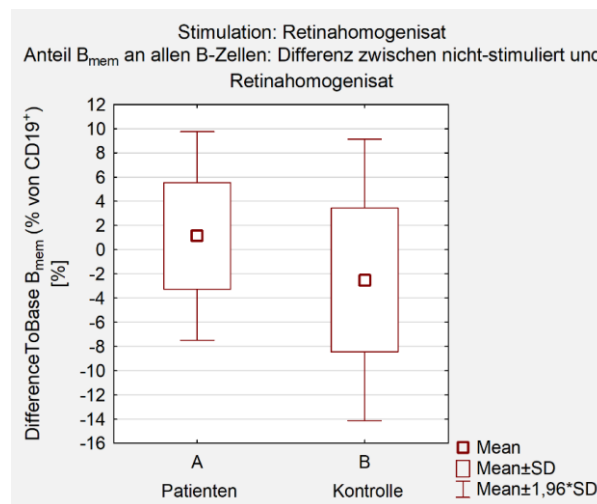


Abbildung 26: Veränderung des Anteils der  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^-$   $B_{\text{mems}}$  an allen  $CD19^+$  B-Zellen durch die Stimulation mit Retinahomogenisat

Darstellung der durchschnittlichen Veränderung des Anteils der  $B_{\text{mem}}$  ( $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^-$ ) an allen B-Zellen ( $CD19^+$ ) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Probanden (X-Achse) durch Stimulation mit Retinahomogenisat im Vergleich zu nicht-stimulierten Proben. Bei Patienten stieg der Anteil der  $B_{\text{mems}}$  leicht, bei gesunden Probanden fiel er. Die Differenz zwischen der Veränderung der Patienten und der der Probanden zeigte sich fast signifikant ( $p = 0,07$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

## 4.1.2.3 Reife B-Zellen

Der Anteil der reifen B-Zellen an allen B-Zellen war bei Patienten und Gesunden ähnlich. Der durchschnittliche Anteil der reifen B-Zellen lag in nicht-stimulierten Proben bei den Patienten bei 45,64 % mit einer Standardabweichung von 11,08 %. Bei gesunden Probanden lag dieser bei 47,81 % mit einer Standardabweichung von 20,93 %. Es konnte weder in den nicht-stimulierten Proben noch nach Stimulation ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden. Exemplarisch ist das Ergebnis der Messung der nicht-stimulierten Proben in Abbildung 27 als Boxplot dargestellt. Eine Übersicht über die statistischen Ergebnisse ist in Tabelle 9 zu sehen.

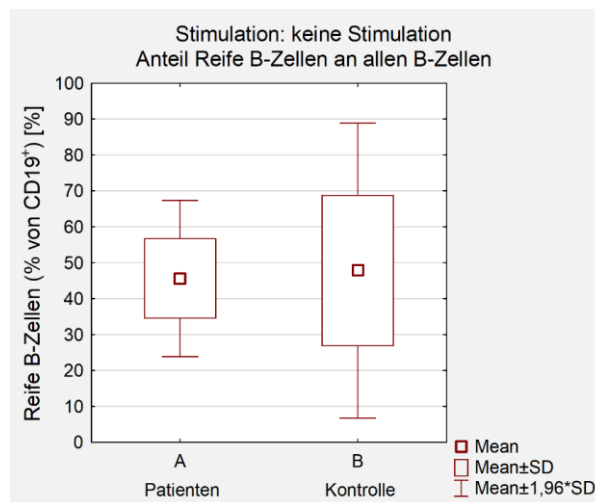


Abbildung 27: Anteil  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  reife B-Zellen an  $CD19^+$  B-Zellen

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von reifen B-Zellen ( $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$ ) an allen B-Zellen ( $CD19^+$ ) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Kontrollen (X-Achse) in nicht-stimulierten Proben. Zwischen Patienten und Kontrollen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

Für den Anteil der reifen B-Zellen an allen B-Zellen wurden in der Literatur Werte von ca. 48 % bis 51 % für beschrieben (38, 41). Der durchschnittliche Anteil bei gesunden Probanden lag in dieser Studie bei 47,81 % und befindet sich demnach sehr nah an dem erwarteten Referenzbereich.

In Abbildung 28 ist die Veränderung des Anteils der reifen B-Zellen durch die Stimulation mit CpG/CD40L und Retinahomogenisat bei Patienten und Kontrollpersonen grafisch dargestellt.

Tabelle 9: Anteile von reifen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup>) an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>)

Stimulation:	Nicht-stimuliert	CpG/CD40L	Retinahomogenisat
$M_{(Patienten)}$	45,64 %	47,78 %	46,84 %
$M_{(Kontrolle)}$	47,81 %	50,03 %	52,47 %
$SD_{(Patienten)}$	11,08 %	12,78 %	11,01 %
$SD_{(Kontrolle)}$	20,93 %	18,29 %	20,84 %
$t (28)$	- 0,35	- 0,39	- 0,90
$p$	0,73	0,70	0,37

Mithilfe des t-Tests wurden die Mittelwerte von Patienten ( $M_{(Patienten)}$ ) und Kontrollen ( $M_{(Kontrollen)}$ ) verglichen, jeweils aufgeteilt nach der Stimulation (Nicht-stimuliert, CpG/CD40L, Retinahomogenisat). M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, t: T-Wert, p: p-Wert

Quelle: Eigene Abbildung

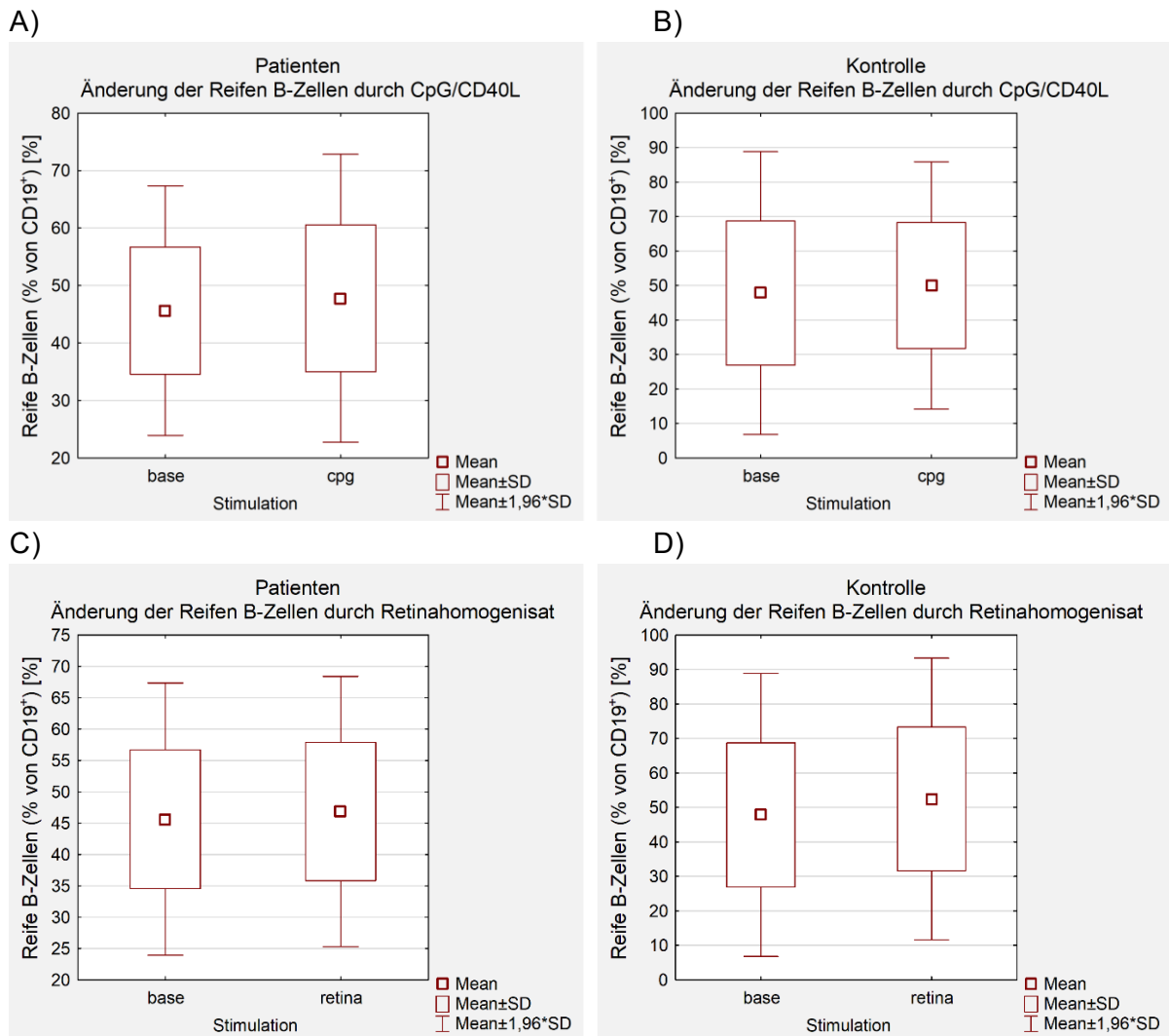


Abbildung 28: Änderung der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup> reifen B-Zellen durch Stimulation

Darstellung der Mittelwerte der Anteile von reifen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup>) an allen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) (Y-Achse; in Prozent) vor und nach der Stimulation mit CpG/CD40L bzw.

Retinahomogenisat (X-Achse) bei A), C) Patienten und B), D) Kontrollen; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

### 4.1.3 Verhältnis der B-Zell-Untergruppen zueinander

#### 4.1.3.1 Verhältnis von regulatorischen B-Zellen und B-Gedächtniszellen

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der regulatorischen B-Zellen zwischen Patienten und Probanden zeigte sich, wenn man diese mit den B-Gedächtniszellen ins Verhältnis setzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis von  $B_{\text{regs}}$  zu  $B_{\text{mems}}$  bei Patienten signifikant kleiner war als bei gesunden Probanden. In nicht-stimulierten Proben lag der Mittelwert der Verhältnisse bei Patienten bei 0,25 mit einer Standardabweichung von 0,28. Bei gesunden Probanden lag der Mittelwert bei 0,56 mit einer Standardabweichung 0,49. Ein  $t$ -Test ergab, dass die Differenz der durchschnittlichen Mittelwerte signifikant war ( $t(28) = -2,06$ ,  $p = 0,049$ ). Nach beiden Stimulationen konnte dieser Unterschied noch deutlicher gezeigt werden. Stimulation mit CpG/CD40L:  $M_{(\text{Patienten})} = 0,37$ ;  $SD = 0,24$ ;  $M_{(\text{Probanden})} = 0,88$ ;  $SD = 0,80$ ;  $t(28) = -2,30$ ,  $p = 0,029$ . Stimulation mit Retinahomogenisat:  $M_{(\text{Patienten})} = 0,10$ ;  $SD = 0,07$ ;  $M_{(\text{Probanden})} = 0,23$ ;  $SD = 0,18$ ;  $t(28) = -2,66$ ,  $p = 0,013$ . Bei Gesunden konnten also mehr regulatorische B-Zellen im Verhältnis zu B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden als bei Patienten. Exemplarisch ist das Ergebnis der Messung der, mit Retinahomogenisat stimulierten, Proben in Abbildung 29 als Boxplot dargestellt.

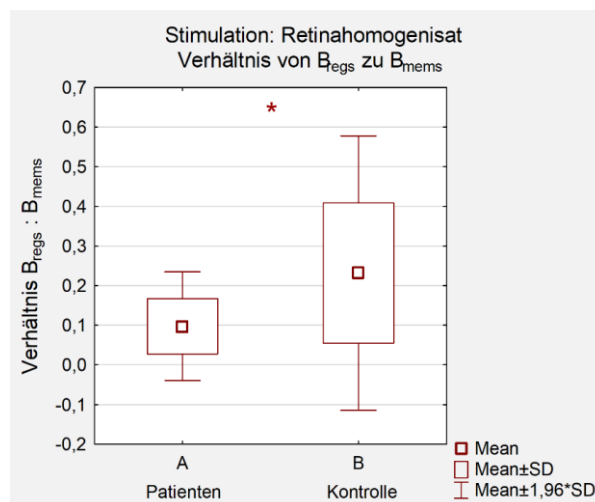


Abbildung 29: Verhältnis von  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^{\text{hi}}$   $B_{\text{regs}}$  zu  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^-$   $B_{\text{mems}}$

Darstellung der Mittelwerte der Verhältnisse von  $B_{\text{regs}}$  ( $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^{\text{hi}}$ ) zu  $B_{\text{mems}}$  ( $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^-$ ) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Kontrollen (X-Achse) in mit Retinahomogenisat stimulierten Proben. Bei Patienten ist der Mittelwert der Verhältnisse von  $B_{\text{regs}}$  zu  $B_{\text{mems}}$  signifikant niedriger als bei Kontrollen ( $p = 0,013$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

## 4.1.3.2 Verhältnis von reifen B-Zellen und B-Gedächtniszellen

Auch das Verhältnis von reifen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen war bei Patienten tendenziell niedriger als bei Gesunden. In nicht-stimulierten Proben lag der Mittelwert der Verhältnisse bei Patienten bei 1,77 mit einer Standardabweichung von 1,42. Bei gesunden Probanden lag der Mittelwert bei 3,60 mit einer Standardabweichung 3,50. Ein  $t$ -Test ergab, dass die Differenz der durchschnittlichen Mittelwerte fast signifikant war ( $t(28) = -1,82, p = 0,08$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach der Stimulation mit CpG/CD40L:  $M_{(Patienten)} = 2,47; SD = 2,00; M_{(Probanden)} = 5,25; SD = 5,41; t(28) = -1,81, p = 0,08$ . Nach der Stimulation mit Retinahomogenisat konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In mit Retinahomogenisat stimulierten Proben lag der Mittelwert der Verhältnisse bei Patienten bei 1,67 mit einer Standardabweichung von 1,21. Bei gesunden Probanden lag der Mittelwert bei 3,87 mit einer Standardabweichung 3,45. Ein  $t$ -Test ergab eine signifikante Differenz der durchschnittlichen Mittelwerte der Verhältnisse von reifen B-Zellen und B-Gedächtniszellen zwischen Patienten und Kontrollen ( $t(28) = -2,27, p = 0,03$ ). Bei Gesunden konnten also mehr reife B-Zellen im Verhältnis zu B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden als bei Patienten. Exemplarisch ist das Ergebnis der Messung der, mit Retinahomogenisat stimulierten, Proben in Abbildung 30 als Boxplot dargestellt.

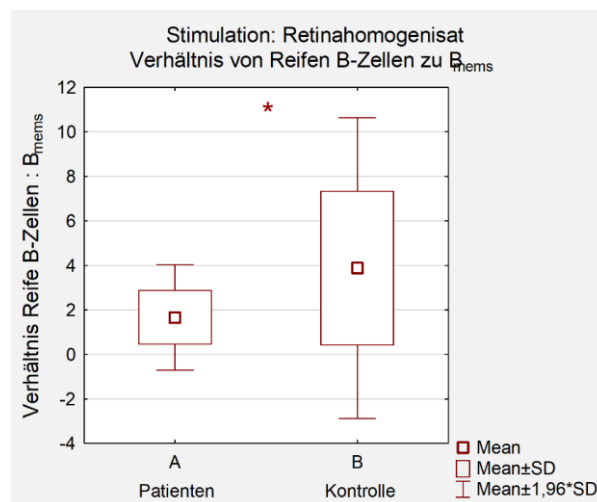


Abbildung 30: Verhältnis von  $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$  reifen B-Zellen zu  $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$  B<sub>mems</sub>

Darstellung der Mittelwerte der Verhältnisse von reifen B-Zellen ( $CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$ ) zu B<sub>mems</sub> ( $CD19^+CD24^{hi}CD38^-$ ) (Y-Achse; in Prozent) von Patienten und Probanden (X-Achse) in mit Retinahomogenisat stimulierten Proben. Bei Patienten ist der Mittelwert der Verhältnisse von reifen B-Zellen zu B<sub>mems</sub> signifikant niedriger als bei Probanden ( $p = 0,031$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

## 4.2 Microarray

### 4.2.1 Serumproben

Es wurden verschiedene Zytokin-Level im Serum von Glaukmapatienten und gesunden Probanden mittels Microarray auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Die deskriptive Statistik sowie die Ergebnisse des *t*-Tests der einzelnen Zytokine sind in Tabelle 10 aufgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich bei den Leveln von CXCL8 ( $p = 0,039$ ) und IL-8 ( $p = 0,015$ ). Bei VEGF-A ist ebenfalls ein Unterschied zu sehen, der mit einem  $p$ -Wert von 0,051 nahezu als signifikant zu werten ist. Auch bei den Leveln von HMGB1 konnte ein Unterschied festgestellt werden. Allerdings zeigte sich bei der Analyse der Microarray-Messergebnisse, dass die gemessenen Werte an der unteren Nachweisgrenze der Messmethode lagen. Auch war bei einigen Proben kein HMGB1 nachweisbar, was an den verringerten Anzahlen der gültigen Ergebnisse deutlich wird (Anzahl gültiger Messwerte bei Patienten: 6 von 14; Anzahl gültiger Messwerte bei Kontrollen: 10 von 16). Daher kann trotz des statistischen Ergebnisses über die HMGB1-Level keine valide Aussage getroffen werden.



Tabelle 10: *t*-Test und deskriptive Statistik der Microarray-Messergebnisse der Serumproben

Zytokin	Patient (Mean)	Kontrolle (Mean)	T-Wert	df	p-Wert	Gültige N (Patient)	Gültige N (Kontrolle)	Std.Dev. (Patient)	Std.Dev. (Kontrolle)
CCL2	0,960	0,759	1,315	24	0,201	11	15	0,478	0,303
CCL5	1,242	0,394	1,726	13	0,108	9	6	1,137	0,435
CTGF	0,949	0,700	1,830	28	0,078	14	16	0,495	0,215
CXCL8	1,018	0,754	2,164	28	0,039	14	16	0,424	0,229
CYR61	0,799	0,610	1,790	28	0,084	14	16	0,387	0,160
EGF	0,839	0,704	1,115	28	0,275	14	16	0,341	0,320
HMGB1	0,108	1,059	-2,675	14	0,018	6	10	0,121	0,854
IL-1A	1,958	1,587	1,306	28	0,202	14	16	0,938	0,605
IL-4	1,032	0,841	0,911	28	0,370	14	16	0,716	0,411
IL-6	1,676	1,541	0,966	28	0,342	14	16	0,403	0,362
IL-8	1,348	0,722	2,653	22	0,015	11	13	0,750	0,375
IL-10	1,405	1,060	1,324	28	0,196	14	16	0,941	0,421
IL-13	1,591	1,095	1,804	28	0,082	14	16	1,057	0,296
IL-18	1,240	0,948	1,706	28	0,099	14	16	0,543	0,389
IL-33	10,810	0,931	1,502	17	0,152	6	13	24,386	1,992
INF- $\gamma$	0,874	0,765	0,335	23	0,741	12	13	0,952	0,662
PLA <sub>2</sub> G5	0,621	0,631	-0,079	9	0,939	6	5	0,232	0,182
PLA <sub>2</sub> G7	0,638	0,491	1,281	28	0,211	14	16	0,405	0,203
TGF- $\beta$ 1	1,250	1,131	0,759	28	0,454	14	16	0,377	0,469
TGF- $\beta$ 2	1,492	0,949	1,230	26	0,230	12	16	1,487	0,832
TNF- $\alpha$	1,863	1,496	1,759	28	0,090	14	16	0,635	0,508
VEGF-A	0,982	0,707	2,039	28	0,051	14	16	0,449	0,281

Von allen untersuchten Zytokinen sind die Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten der Patienten und Kontrollen (Mean), die Anzahl der gültigen Messwerte sowie die Ergebnisse des *t*-Tests (T-Wert, df, *p*-Wert, Standardabweichungen) dargestellt. Je niedriger der *p*-Wert, desto intensiver sind die Felder gefärbt.

Quelle: eigene Abbildung

Für die durchgeführte Untersuchung wurde das laborinterne Standardpanel für Microarray-Analysen dieser Art verwendet. Dabei wird mit den Antikörpern gegen CXCL8 und IL-8 dasselbe Zytokin nachgewiesen. Für beide zeigte sich ein in gleicher Weise veränderter statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden. Durch den Nachweis des gleichen Effekts bei beiden verwendeten Antikörpern wird die Validität der Messmethode im Sinne einer Positivkontrolle unterstrichen. Im Folgenden wird auf IL-8 näher eingegangen. IL-8 ist ein proinflammatorisches Chemokin, das insbesondere Neutrophile Granulozyten, aber auch Basophile Granulozyten und B-Zellen zum Infektionsherd lockt (28, S. 314). In unserer Studie konnte festgestellt werden, dass IL-8 bei POAG-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant ( $p = 0,015$ ) erhöht ist. Eine Darstellung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten als Boxplot ist in Abbildung 31 zu sehen.

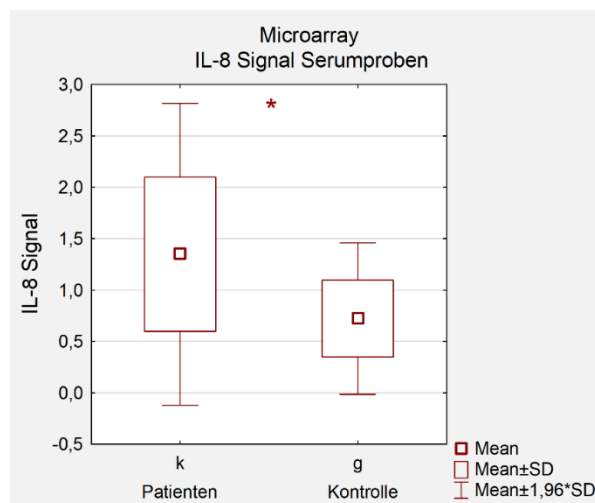


Abbildung 31: Microarray - normalisierte Fluoreszenz-Intensitäten von IL-8

Darstellung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten von IL-8 (Y-Achse) von Patienten und Probanden (X-Achse) als Boxplot. Bei Patienten ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten signifikant höher als bei Probanden ( $p = 0,015$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; \*  $p < 0,05$

Quelle: Eigene Abbildung

Neben IL-8 ist auch bei VEGF-A ein Unterschied zu erkennen. Mit einem  $p$ -Wert von 0,051 lässt sich zwar keine Signifikanz, aber eine deutliche Tendenz nachweisen. VEGF-A ist ein Signalmolekül, welches eine Erweiterung von Gefäßen sowie eine Erhöhung der Permeabilität bewirkt und an der Angiogenese beteiligt ist (28, S. 99 f.). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass POAG-Patienten tendenziell höhere Level von VEGF-A im peripheren Blut aufweisen als gesunde Probanden. Eine Darstellung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten als Boxplot ist in Abbildung 32 zu sehen.

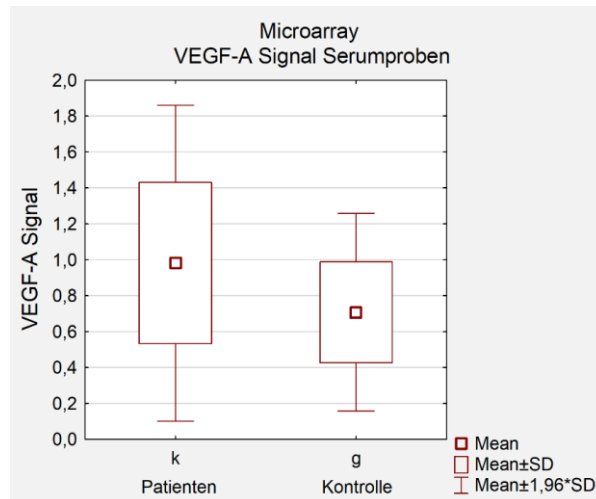


Abbildung 32: Microarray - normalisierte Fluoreszenz-Intensitäten von VEGF-A

Darstellung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten von VEGF-A (Y-Achse) von Patienten und Probanden (X-Achse) als Boxplots. Bei Patienten ist der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensitäten tendenziell höher als bei Probanden ( $p = 0,051$ ). Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Quelle: Eigene Abbildung

Bei den von regulatorischen B-Zellen sezernierten Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$  konnten keine Unterschiede zwischen den Leveln im peripheren Blut von POAG-Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden (vgl. Tabelle 10).

#### 4.2.2 Überstände

Die verschiedenen Zytokin-Level wurden ebenfalls in den Überständen aus den Zellkulturansätzen untersucht. Dabei waren im ersten Zellkulturansatz die PBMCs von Glaukompatienten und gesunden Probanden mit CpG und CD40L und im zweiten Zellkulturansatz mit Retinahomogenisat stimuliert worden. Die Überstände wurden jeweils als Poolproben mittels Microarray auf Unterschiede hin untersucht. Eine Übersicht über die vier verschiedenen Poolproben ist in Tabelle 11 zu sehen.

Mittels Fold Change-Berechnungen wurden die Ergebnisse von Patienten mit denen von gesunden Probanden ins Verhältnis gesetzt, aufgeteilt nach Stimulation. Somit ließ sich eine Aussage treffen, ob nach der jeweiligen Stimulation ein Unterschied in den Zytokinleveln von POAG-Patienten und Kontrollpersonen zu erkennen ist. Die Fold Change-Berechnungen aufgeteilt nach Stimulation sind in Tabelle 12 dargestellt. Dabei ist in der linken Spalte das Verhältnis der Ergebnisse von Patienten zu Kontrollpersonen nach Stimulation mit CpG/CD40L und in der rechten Spalte das nach Stimulation mit Retinahomogenisat zu sehen.

Tabelle 11: Übersicht der Überstand-Poolproben

Poolprobe	Stimulation	Gruppe
1)	CpG/CD40L	Patienten
2)	CpG/CD40L	Kontrollen
3)	Retinahomogenisat	Patienten
4)	Retinahomogenisat	Kontrollen

Übersicht über die vier verschiedenen Überstand-Poolproben. Die Überstände aus den Zellkulturen der PBMCs wurden jeweils nach Stimulation des Zellkulturansatzes (CpG/CD40L) und nach Gruppe (Patienten/Kontrollen) aufgeteilt und als Poolproben mittels Microarray gemessen.

Quelle: Eigene Darstellung

Tabelle 12: Fold Change Überstand-Poolproben – Patienten im Verhältnis zu Kontrollen

Zytokin	Stimulation	
	CpG/CD40L	Retinahomogenisat
CCL2	0,1238	-0,1168
CCL5	0,4726	0,4702
CTGF	0,1571	-0,1291
CXCL8	0,1288	0,1306
CYR61	0,1107	-0,0023
EGF	0,1767	-0,1810
HMGB1	kein Nachweis	kein Nachweis
IL-1A	0,1374	-0,2939
IL-4	0,9512	-0,2873
IL-6	-0,0905	-0,2021
IL-8	0,5669	-0,2934
IL-10	0,1762	-0,2495
IL-13	0,2974	-0,0505
IL-18	0,1488	-0,2091
IL-33	-0,0456	-0,1373
INF- $\gamma$	-0,0797	-0,5644

PLA <sub>2</sub> G5	0,5051	kein Nachweis
PLA <sub>2</sub> G7	0,0157	-0,3779
TGF-β1	0,1684	-0,0837
TGF-β2	0,3134	0,4448
TNF-α	0,2458	-0,1669
VEGF-A	0,0247	-0,0487

Von allen untersuchten Zytokinen sind die Fold Change-Berechnungen der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten von Patienten im Verhältnis zu Kontrollen aufgeteilt nach Stimulation dargestellt. Bei Werten von  $< -1$  und  $> 1$  wurde davon ausgegangen, dass zwischen Patienten und Probanden ein Unterschied in den Leveln der Zytokinexpression vorlag. Je intensiver ein Feld gefärbt ist, desto näher liegt der Wert an diesen Grenzen. Eine Grünfärbung bedeutet, dass das jeweilige Zytokinlevel bei Patienten höher ist als bei Kontrollen. Eine Rotfärbung bedeutet, dass das jeweilige Zytokinlevel bei Patienten niedriger ist als bei Kontrollen.

Quelle: Eigene Abbildung

In dieser Untersuchung zeigte lediglich das IL-4-Level nach der Stimulation mit CpG/CD40L einen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Das Level von IL-4 war nach der Stimulation mit CpG/CD40L bei POAG-Patienten annähernd doppelt so hoch wie bei gesunden Probanden ( $\log_2$  Fold Change = 0,9512). IL-4 ist ein Zytokin, das eine B-Zell-Aktivierung, einen IgE-Klassenwechsel, eine T<sub>H</sub>1-Suppression und eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung bewirkt (28, S. 314). Durch diese Funktionen wird ihm insbesondere eine antiinflammatorische, aber auch eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben (31).

## 5 Diskussion

Die Rolle der B-Zellen und insbesondere der regulatorischen B-Zellen in Bezug auf das primäre Offenwinkelglaukom wurde bisher nicht näher erforscht. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung regulatorischer B-Zellen und deren Zytokine im peripheren Blut von Glaukompatienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Es konnten veränderte Zellzahlen der Lymphozyten sowie der verschiedenen B-Zellen festgestellt werden. Dabei waren die Lymphozyten bei den Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Vergleichspersonen. Die Anzahl der gesamten B-Zellen unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen, allerdings konnten innerhalb der B-Zell-Subtypen Unterschiede gefunden werden. Der Anteil der regulatorischen B-Zellen war bei Glaukompatienten tendenziell niedriger als bei gesunden Probanden. Bei den B-Gedächtniszellen verhielt es sich umgekehrt, der Anteil der  $B_{\text{mems}}$  war bei Patienten tendenziell höher als bei Gesunden. Die Anteile der reifen B-Zellen waren bei beiden Gruppen ähnlich. Allerdings unterschieden sich die Verhältnisse von  $B_{\text{regs}}$  zu  $B_{\text{mems}}$  sowie von reifen B-Zellen zu  $B_{\text{mems}}$  zwischen Patienten und Kontrollpersonen signifikant. Das Verhältnis von regulatorischen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen war bei Patienten signifikant niedriger als bei Kontrollpersonen. Bei Glaukompatienten konnten also signifikant weniger  $B_{\text{regs}}$  im Verhältnis zu  $B_{\text{mems}}$  nachgewiesen werden als bei Gesunden. Auch bezüglich des Verhältnisses von reifen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Bei Patienten war das Verhältnis von reifen B-Zellen zu  $B_{\text{mems}}$  tendenziell niedriger als bei Vergleichspersonen. Nach der Stimulation mit Retinahomogenisat konnte sogar ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auch in den Zytokinleveln konnten Unterschiede zwischen Glaukompatienten und gesunden Probanden festgestellt werden. So zeigte sich das Level von IL-8 im Serum von Patienten signifikant erhöht gegenüber dem bei Gesunden. Das Level von VEGF-A im peripheren Blut war bei POAG-Patienten ebenfalls tendenziell höher als in der Vergleichsgruppe. Nach der Stimulation mit CpG/CD40L konnte in den Kulturüberständen bei Patienten ein annähernd doppelt so hohes Level an IL-4 festgestellt werden wie bei gesunden Probanden.

### 5.1 Bedeutung der veränderten B-Zellzahlen

#### 5.1.1 Regulatorische B-Zellen

##### 5.1.1.1 Phänotyp der regulatorischen B-Zellen

Seit der ersten Beschreibung einer immunsupprimierenden Gruppe von B-Zellen wurden mehrere B-Zell-Untergruppen entdeckt, die das immunsuppressive IL-10 produzieren. Diese gehören teilweise verschiedenen B-Zell-Subtypen an, werden aber aufgrund ihrer Funktion als regulatorische B-Zellen zusammengefasst (49). Es wurden  $B_{\text{regs}}$  in den Gruppen der  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD38^{\text{hi}}$  transitionalen B-Zellen (41), der  $CD19^+CD24^{\text{hi}}CD27^+$  B-Zellen (B10-Zellen) (96), der  $CD19^+CD38^+CD1d^+IgM^+CD147^+$

Granzym B positiven B-Zellen (97), der CD25<sup>hi</sup>CD71<sup>hi</sup>CD73<sup>lo</sup> B-Zellen (Br1-Zellen) (98) sowie in der Gruppe der CD27<sup>int</sup>CD38<sup>hi</sup> Plasmablasten beschrieben (49, 99). Da sich CD1d<sup>+</sup> regulatorische B-Zellen vor allem in der Gruppe der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitionalen B-Zellen konzentrieren, sind die Granzym B positiven Zellen am ehesten den transitionalen B-Zellen zuzuordnen (41). Alle genannten B<sub>regs</sub> entfalten ihre immunsuppressive Wirkung unter anderem durch die Sekretion von IL-10 (49). Es konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitionalen B-Zellen die höchste Anzahl an IL-10 produzierenden Zellen im Vergleich zur Gruppe der reifen B-Zellen oder der B-Gedächtniszellen zu finden ist (41). Auch konnte belegt werden, dass CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B-Zellen nach in vitro Stimulation mit CD40L signifikant mehr IL-10 produzieren als reife B-Zellen (48). Auffallend ist allerdings, dass weniger als 20 % der B-Zellen innerhalb aller genannten Gruppen IL-10 produzieren und die Immunantwort hemmen (32). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren bleibt weiterhin ungeklärt, ob B<sub>regs</sub> eine funktionelle Zelllinie repräsentieren oder ob darunter eine Vielzahl von Zelllinien zusammengefasst wird (49). Die verschiedenen Arten der B<sub>regs</sub> könnten sich jeweils aus verschiedenen Vorläuferzellen entwickeln oder aber auch auf eine gemeinsame Vorläuferzelle zurückgehen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Oberflächenmerkmale der B<sub>regs</sub> lediglich Ausdruck verschiedener Differenzierungsstufen darstellen. Eine weitere Erklärung für die verschiedenen Phänotypen ist, dass B<sub>regs</sub> durch Umgebungsreize induziert werden und theoretisch jede B-Zelle eine regulatorische Funktion annehmen kann (49). In dieser Studie wurden die regulatorischen B-Zellen mit dem Phänotyp CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> untersucht, da diese, wie weiter oben beschrieben, nachweislich mehr IL-10 produzieren als reife B-Zellen sowie die höchste Anzahl an IL-10-produzierenden Zellen im Vergleich zur Gruppe der reifen B-Zellen oder der B-Gedächtniszellen enthalten (41, 48). Auch konnte für diese CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B<sub>regs</sub> eine immunsuppressive Wirkung bewiesen werden, welche sie durch verschiedene Mechanismen entfalten. Diese sind im folgenden Kapitel (Abschnitt 5.1.1.2) genauer dargestellt.

#### 5.1.1.2 Mechanismen der Immunsuppression

Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben mithilfe derer regulatorische B-Zellen eine exzessive Immunreaktion hemmen. Wichtig dabei ist die Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35 (32). Über die Ausschüttung von IL-10 hemmen regulatorische B-Zellen die T<sub>H</sub>1-Antwort, inhibieren die Differenzierung von T-Zellen zu T<sub>H</sub>17-Zellen und induzieren die Umwandlung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>regs</sub> (41, 48). Außerdem wird die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen gehemmt (41). Der suppressive Effekt wird nicht allein durch die Ausschüttung von IL-10 erreicht, sondern durch ein Zusammenspiel von IL-10 und den auf den B<sub>regs</sub> exprimierten Oberflächenmolekülen CD80 und CD86 (41, 100). CD80 und CD86 sind costimulierende Oberflächenproteine, die von Zellen der adaptiven Immunantwort, insbesondere von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, erkannt werden (29, S. 128). Es wird vermutet, dass die Interaktion der B<sub>regs</sub> mit den CD4<sup>+</sup> T-Zellen über CD80 und CD86 synergistisch mit der Ausschüttung von IL-10 zur Hemmung der

Zytokinproduktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen beiträgt (41, 100). Weiterhin können B<sub>regs</sub> mittels IL-10 eine antigenspezifische Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen hemmen (101) und die Produktion von TNF- $\alpha$  durch Monozyten regulieren (96). Auch konnte gezeigt werden, dass mithilfe von IL-10 eine antigenspezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen supprimiert wird (98).

Eine weitere Methode der Suppression ist die Ausschüttung von TGF- $\beta$ . Es wurde herausgefunden, dass T-Zellen, welche das Oberflächenprotein CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) exprimieren, B-Zellen zur Differenzierung zu regulatorischen B-Zellen anregen können (32). Diese induzierten regulatorischen B-Zellen (iB<sub>regs</sub>) wiederum können T-Zellen über die Produktion von TGF- $\beta$  in T<sub>regs</sub> umwandeln (102).

Die dritte wichtige Funktionsweise der Immunsuppression ist die Sekretion von IL-35. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welche keine IL-35<sup>+</sup> B<sub>regs</sub> besitzen, sich nicht von einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis erholen konnten (103). Auf der anderen Seite waren solche Mäuse aber deutlich resistenter gegenüber einer intrazellulären Infektion mit *Salmonella typhimurium*. Diese erhöhte Immunität ist mit einer höheren Aktivität von Makrophagen und inflammatorischen T-Zellen sowie mit einer verstärkten stimulierenden Funktion von B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen assoziiert (103). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-35<sup>+</sup> B<sub>regs</sub> die Differenzierung von T-Zellen zu T<sub>regs</sub> bewirken (104).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die verschiedenen Phänotypen der B<sub>regs</sub> teilweise überlappende, teilweise aber auch unterschiedliche Mechanismen der Immunsuppression belegt werden konnten (32). Insbesondere für die in dieser Studie untersuchten Zellen wurde Folgendes herausgefunden: Auch die CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitionalen B<sub>regs</sub> entfalten ihre immunsuppressive Wirkung über verschiedene Mechanismen. Es wurde gezeigt, dass diese Zellen zum einen die Immunantwort hemmen, indem sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren (41, 83). Auch können diese B<sub>regs</sub> mittels IL-10 eine antigenspezifische Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen hemmen (101). Zum anderen regulieren sie die Immunantwort, indem sie die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>H1</sub>- und T<sub>H17</sub>-Zellen unterdrücken und die Umwandlung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>regs</sub> induzieren (48).

#### 5.1.1.3 Rolle der B<sub>regs</sub> in Autoimmunkrankheiten

Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) (72), dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE) (41, 105) und der Rheumatoiden Arthritis (RA) (48) wurden Veränderungen der Anzahl sowie der Funktion von regulatorischen B-Zellen beschrieben. Einige Studien konnten eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl und Funktion der B<sub>regs</sub> und der Krankheitsaktivität nachweisen (32, 48). Bei der Multiplen Sklerose konnte eine verminderte Anzahl an IL-10-produzierenden B<sub>regs</sub> bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden (72). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Interferon  $\beta$ , welche bei der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt wird, durch eine Expansion der



CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B<sub>reg</sub>-Population ihre Wirkung entfaltet (106). Auch bei der Rheumatoiden Arthritis konnte bei Patienten eine verminderte Anzahl an B<sub>regs</sub> nachgewiesen werden (48). Zusätzlich konnte bei SLE sowie bei RA gezeigt werden, dass die regulatorischen B-Zellen bei Patienten in ihrer Funktion eingeschränkt sind (41, 48, 105). Auch für Glaukompatienten konnte in der vorliegenden Studie festgestellt werden, dass der Anteil der regulatorischen B-Zellen bei Erkrankten tendenziell niedriger ist als bei gesunden Probanden.

Diese Erkenntnisse lassen auf zwei verschiedene Möglichkeiten der Rolle von B<sub>regs</sub> bei Autoimmunerkrankungen sowie beim Glaukom schließen. Entweder führt die Verringerung von B<sub>regs</sub> und damit von deren immunsuppressiven Wirkung zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion und einer damit verbundenen Schädigung von Geweben. Oder aber die verminderte Anzahl und eingeschränkte Funktion der B<sub>regs</sub> ist eine Konsequenz der chronischen Entzündungsreaktion bei Autoimmunerkrankungen (32). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von IL-10-produzierenden B-Zellen zur Ausbildung einer exazerbierten Arthritis führt und eine Erholung von einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis verhindert (46, 47, 107). Durch einen adoptiven Transfer von verschiedenen Maus-B<sub>regs</sub> können diese autoimmunen Erkrankungen allerdings supprimiert werden (47, 87, 108). Auch konnte festgestellt werden, dass proinflammatorische Signale zu einer Erhöhung der Anzahl von regulatorischen B-Zellen führen (109). Insgesamt sprechen diese Erkenntnisse eher für eine ursächliche Rolle der B<sub>regs</sub> an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Allerdings wurde der Großteil der Studien zu diesem Thema im Tiermodell durchgeführt, sodass die gewonnenen Erkenntnisse lediglich auf den Menschen übertragen werden konnten (32). Zusammenfassend lässt sich nicht sicher sagen, ob die B<sub>regs</sub> ursächlich an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt sind oder aber die tendenziell verminderte Anzahl als Konsequenz oder Epiphänomen der Erkrankung auftritt. Um ein besseres Verständnis für die Rolle der B<sub>regs</sub> im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen sowie im Gesamtzusammenhang von autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen zu erlangen, wird dies im anschließenden Abschnitt näher beleuchtet.

### **5.1.2 Rolle der B-Zellen in autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen**

Da es sich beim Glaukom um eine neurodegenerative Erkrankung mit autoimmuner Beteiligung an der Pathogenese handelt, wird die Rolle der B-Zellen bei anderen neurodegenerativen und autoimmunen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) im Folgenden näher untersucht. B-Zellen haben sowohl eine proinflammatorische Funktion durch Antikörperproduktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine als auch eine immunsupprimierende Funktion durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen (siehe Abschnitt 2.3.2 sowie 2.3.3.2). Bei der Betrachtung von B-Zell-Leveln im peripheren Blut können Unterschiede zwischen Patienten, welche an unterschiedlichen neurodegenerativen und autoimmunen Krankheiten leiden, und gesunden Personen festgestellt werden (110).

#### 5.1.2.1 Parallelen bei Alzheimer-Demenz

Bei an Alzheimer-Demenz leidenden Patienten kann ein verschobenes Verhältnis von reifen B-Zellen und B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Die reifen B-Zellen sind bei Patienten signifikant niedriger als bei Gesunden und der Anteil an doppelt negativen B-Gedächtniszellen, welche einen gut differenzierten Subtyp der Gedächtniszellen darstellen, ist bei Patienten signifikant erhöht (111). In dieser Studie kann bei reifen B-Zellen kein relevanter Unterschied zwischen Glaukmapatienten und Gesunden festgestellt werden. Die Anzahl der B-Gedächtniszellen ist allerdings bei Erkrankten ebenso wie bei Alzheimer-Patienten erhöht und das Verhältnis von reifen B-Zellen zu  $B_{\text{mems}}$  zeigt sich bei Erkrankten zugunsten der B-Gedächtniszellen verschoben, was sich durch die Stimulation mit Retinahomogenisat noch verstärkt. Bei an Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten besteht eine chronische systemische Entzündungsreaktion mit erhöhten Leveln von proinflammatorischen Zytokinen im peripheren Blut (111, 112). Als Konsequenz durchleben die Immunzellen Veränderungen. Durch die proinflammatorischen Zytokine werden sie stimuliert und es tritt eine erhöhte Immunzellendifferenzierung auf, welche letztlich zur Erschöpfung der Zellen führt (111, 113). Das verschobene Verhältnis von reifen B-Zellen zu  $B_{\text{mems}}$  könnte dadurch zustande kommen, dass reife naive B-Zellen durch die chronische systemische Entzündungsreaktion vermehrt zu B-Gedächtniszellen differenzieren. Dies könnte zu einer Erschöpfung des Pools von reifen B-Zellen und zu einer Erhöhung der gut differenzierten  $B_{\text{mems}}$  führen (111).

Auch beim Glaukom deuten verschiedene Veränderungen der Immunreaktionen gegen Retina- und Sehnervenantigene im Serum von Glaukmapatienten auf eine systemische Immunreaktion hin (22). So sind im Serum von Glaukmapatienten teilweise hoch-, teilweise herunterregulierte Autoantikörperkonzentrationen sowie Veränderungen der T-Lymphozyten und Makrophagen nachweisbar (22, 50-53, 55). Außerdem konnte eine erhöhte Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio (PLR) sowie Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (NLR), welche als Merkmale für eine systemische Entzündung gelten, im peripheren Blut von Glaukmapatienten nachgewiesen werden (114, 115). Auch die in dieser Studie festgestellte Erhöhung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 und des Angiogenesefaktors VEGF-A im Serum von Glaukmapatienten (siehe dazu Abschnitt 5.3) unterstützt diese Vermutung. Es könnte also bei Glaukmapatienten ähnlich wie bei an Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten durch eine chronische systemische Entzündungsreaktion zu einer erhöhten Immunzellendifferenzierung, Erschöpfung des reifen B-Zell-Pools und dadurch zu einer erhöhten Anzahl an B-Gedächtniszellen kommen.

#### 5.1.2.2 Parallelen bei Multipler Sklerose

Auch bei Patienten mit Multipler Sklerose können Veränderungen bei B-Zellen im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden (110). Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von proinflammatorischen IL-6-produzierenden B-Zellen zu antiinflammatorischen IL-10-produzierenden B-Zellen einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Bei Patienten mit einem zu Lasten der IL-10-produzierenden

Zellen verschobenen Verhältnis konnte ein signifikanter Zusammenhang mit einem Fortschreiten der MS festgestellt werden. Dabei ist insbesondere die verminderte Produktion von IL-10 durch transitionale regulatorische B-Zellen ausschlaggebend (116). Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von B-Zellen an der Pathogenese der MS sind fehlgeschlagene klinische Studien zur Therapie von MS und Neuritis nervi optici mit Atacicept (110, 117, 118). Atacicept ist ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein, welches die Reifungs- und Überlebensfaktoren BAFF und APRIL (Mitglied 13 der TNF Liganden Superfamilie) von B-Zellen hemmt (29, S. 1092 f., 110, 118). Die Studien mussten vorzeitig abgebrochen werden, da es bei Patienten, welche Atacicept erhalten hatten, zu vermehrten Schüben der MS kam (117, 118). Die erhöhte Schubrate war mit einer Reduktion von reifen B-Zellen, welche nach der Beendigung der Therapie von Atacicept wieder auf normale Level anstiegen, assoziiert (118). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Therapie mit Atacicept eine Erhöhung der Anzahl von B-Gedächtniszellen bewirkt (119) und eine Erhöhung von BAFF, welches durch Atacicept gehemmt wird, zu einem Anstieg von IL-10-produzierenden regulatorischen B-Zellen im Zellkultur-Modell führt (120). Durch Atacicept wird also das Gleichgewicht von regulatorischen und reifen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen zugunsten der B-Gedächtniszellen beeinflusst. Schließlich konnte gezeigt werden, dass ein anderes Medikament, Mitoxantron, zur Verbesserung der B-Zell-Level bei MS-Patienten führt (43). Mitoxantron ist ein Chemotherapeutikum, das für die Behandlung von aggressiv verlaufender MS eingesetzt wird (43, 121). Es reduziert signifikant die Frequenz von Schüben und das Risiko für Progression der MS (121). Durch die Behandlung mit Mitoxantron wird der Anteil von zirkulierenden B-Gedächtniszellen, welche für den Großteil der sezernierten proinflammatorischen Zytokine Lymphotoxin und TNF- $\alpha$  verantwortlich sind, signifikant reduziert. Dadurch wird auch die Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine signifikant verringert. Die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 hingegen wird bei MS-Patienten durch Mitoxantron signifikant erhöht (43).

Im Hinblick auf das Glaukom zeigt sich auch in dieser Studie ein tendenziell verminderter Anteil von regulatorischen B-Zellen an allen B-Zellen bei Glaukompatienten im Vergleich zu Gesunden. Zwar kann in der Microarray-Analyse kein Unterschied der IL-10-Level zwischen Patienten und Probanden festgestellt werden (siehe Abschnitt 5.4). Interessanterweise ist das Verhältnis von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  bei Glaukompatienten aber signifikant niedriger als bei gesunden Vergleichspersonen. Auch das Verhältnis von reifen B-Zellen zu  $B_{mems}$  ist bei Patienten tendenziell niedriger als bei Kontrollpersonen. Wie auch bei der MS scheint das Gleichgewicht zwischen antiinflammatorisch wirkenden regulatorischen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen, welche den Großteil der proinflammatorischen Zytokine sezernieren, verschoben zu sein. Dieses aus dem Gleichgewicht geratene Verhältnis ist bei der MS mit einem Fortschreiten der Erkrankung bzw. vermehrt auftretenden Schüben assoziiert. Wird das Verhältnis von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  durch das Medikament Mitoxantron zugunsten der  $B_{regs}$  verbessert, so kommt es zu einer Reduktion der Frequenz von Schüben sowie des Risikos für Progression. Insgesamt könnte das Auftreten dieses verschobenen Verhältnisses bei MS sowie beim Glaukom auf eine Rolle der B-Zellen im Rahmen der

Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen hindeuten. Möglicherweise begünstigt ein Ungleichgewicht von regulatorischen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen die Entstehung oder das Fortschreiten von Neurodegeneration. Insbesondere die erfolgreiche Therapie der MS durch eine Veränderung des Verhältnisses der B-Zell-Untergruppen lässt B-Zellen als möglichen Angriffspunkt für zukünftige Therapieoptionen des Glaukoms interessant erscheinen.

#### 5.1.2.3 Parallelen bei Immunthrombozytopenie

Ein Ungleichgewicht der B-Zell-Subtypen konnte auch bei der Immunthrombozytopenie (ITP) festgestellt werden. Bei Patienten, welche an ITP leiden, kann eine signifikant erhöhte Frequenz von B-Gedächtniszellen sowie eine signifikant erniedrigte Frequenz von transitionalen regulatorischen B-Zellen nachgewiesen werden. Nach Erhalt der First-Line-Therapie, welche aus Methylprednisolon und intravenös verabreichten Immunglobulinen (IVIg) besteht, kehren die Level der B-Gedächtniszellen und der transitionalen regulatorischen B-Zellen wieder auf ein normales Niveau zurück (122). Fang et al. folgerten daraus, dass die erniedrigte Zahl an  $B_{regs}$  möglicherweise für die Erhöhung des  $B_{mems}$  verantwortlich ist. Durch die Verringerung der regulatorischen B-Zellen könnte die Hemmung von B-Gedächtniszellen abgeschwächt werden, was zu einem Anstieg dieser führt (122).  $B_{mems}$  wiederum können nach ihrer Aktivierung durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen als antigenpräsentierende Zellen fungieren, proinflammatorische Zytokine produzieren und schnell zu antikörperproduzierenden Plasmablasten differenzieren (123). Dabei kommt es zu einer schnelleren Antikörperproduktion mit höher affinen Antikörpern als bei der Aktivierung von naiven reifen B-Zellen im Rahmen eines Primärkontakts (29, S. 616 ff.). Diese Mechanismen können letztlich zu einer Schädigung von Gewebe führen und könnten so an der Krankheitsentstehung der ITP beteiligt sein (122, 123).

Aufgrund des gleichartig veränderten Verhältnisses von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  bei Glaukompatienten könnten dem Glaukom ähnliche pathogenetische Veränderungen zugrunde liegen. Möglicherweise spielt die verminderte Anzahl der  $B_{regs}$ , welche zu einer Erhöhung der  $B_{mems}$  führen könnte, also eine Rolle bei der Entstehung des Glaukomschadens. Interessant ist auch, dass durch die First-Line-Therapie bei ITP das Gleichgewicht zwischen  $B_{mems}$  und  $B_{regs}$  wiederhergestellt werden kann (122). Da in dieser Studie ein in gleicher Weise verschobenes Verhältnis von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  bei Glaukompatienten festgestellt wurde, stellt sich die Frage nach einer möglichen Wirksamkeit der ITP-First-Line-Therapie auch beim Glaukom. Da Methylprednisolon als Glukokortikoid bei disponierten Personen durch topische oder systemische Gabe zu einem Augeninnendruckanstieg mit sekundärem Offenwinkelglaukom führen kann, kommt dies als Therapieoption nicht in Frage (6). Für eine mögliche Wirksamkeit von IVIGs sprechen jedoch verschiedene Punkte. Die intravenös verabreichten Immunglobuline werden aus dem Plasma von gesunden Spendern gewonnen und enthalten einen Großteil des Repertoires humaner IgG-Antikörper, darunter auch natürlich vorkommende Autoantikörper (124, 125). Natürlich vorkommende Autoantikörper sind Antikörper, welche keine Krankheiten hervorrufen und auch bei Gesunden zu finden sind. Sie werden als regulatorische Faktoren eingestuft (22, 126).

Bezüglich des Glaukoms konnte gezeigt werden, dass bestimmte natürliche Autoantikörper, die bei Glaukompatienten herunterreguliert sind, einen direkten protektiven Effekt auf retinale Ganglienzellen haben (11, 56, 57). IVIGs haben eine immunmodulatorische Wirkung und zeigen für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, bei welchen natürlich vorkommende Autoantikörper auftreten, vielversprechende Hinweise als mögliche Therapieoption (11, 125). So könnte für eine mögliche Wirksamkeit der IVIGs beim Glaukom neben der Wirkung durch Autoantikörper auch ein immunmodulatorischer Effekt durch den Einfluss auf das Gleichgewicht der B-Zellen sprechen. Die Idee, IVIGs bei neurodegenerativen Erkrankungen einzusetzen, ist nicht neu. So wurden bereits erfolgreich verlaufende Vorstudien zur möglichen Wirksamkeit bei Alzheimer-Demenz durchgeführt. Trotz einer vielversprechenden Ausgangslage für IVIGs als Therapieoption bei der Alzheimer-Demenz konnte in einer Phase III Studie allerdings keine Wirksamkeit bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (124, 127). Die Verantwortlichen der Studie führen das auf eine möglicherweise zu gering gewählte Dosis oder einen zu späten Therapiebeginn im Krankheitsverlauf zurück (124). Ob IVIGs als Therapieoption beim Glaukom wirksam sein könnten, bedürfte also intensiver Nachforschungen und kann anhand der jetzigen Datenlage nicht sicher vorausgesagt werden.

#### 5.1.2.4 Parallelen bei MOG-Ab-assoziiierter Erkrankung und AQP4-Ab-positiver Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der B-Zell-Level konnten bei der Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antikörper-assoziierten Erkrankung (MOG-Ab-assoziierte Erkrankung) sowie bei der Aquaporin-4-Antikörper-seropositiven Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung (AQP4-Ab-positiv NMOSD) gezeigt werden (128). Die MOG-Ab-assoziierte Erkrankung sowie die AQP4-Ab-positiv NMOSD werden wie die MS zu den entzündlichen demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS gezählt (129). Die Frequenz von transitionalen regulatorischen B-Zellen ist bei an MOG-Ab-assoziiierter Erkrankung leidenden Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erniedrigt. Die Frequenz von B-Gedächtniszellen hingegen zeigt sich bei den Patienten signifikant erhöht. Auch Patienten mit AQP4-Ab-positiv NMOSD weisen ein ähnliches Profil der Lymphozyten auf (128).

Sowohl bei Glaukompatienten als auch bei Patienten, die an anderen neurodegenerativen oder demyelinisierenden Erkrankungen leiden, zeigt sich eine Erhöhung der B-Gedächtniszellen und eine Verminderung von regulatorischen B-Zellen. Diese Ergebnisse könnten auf einen Zusammenhang zwischen dem Ungleichgewicht der B-Zell-Level und Demyelinisierung hindeuten. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass Demyelinisierung dem Verlust von Axonen in der Ausbreitung von neurodegenerativen Erkrankungen vorausgeht (130). Dieser Zusammenhang zwischen dem B-Zell-Ungleichgewicht, Demyelinisierung und Neurodegeneration könnte auch für die Entstehung des Glaukoms relevant sein. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es bei Ratten, die mit einem Homogenisat aus Sehnerventigen immunisiert wurden, zu einem signifikanten Verlust von retinalen Ganglienzellen kommt. Außerdem wurden bei

diesen Tieren erhöhte autoreaktive Antikörper, die gegen Antigene der Retina, des Sehnervs und des Gehirns gerichtet waren, nachgewiesen. Zusätzlich zeigte sich in den Sehnerven der immunisierten Ratten eine Antikörper-Akkumulation, eine Aktivierung von Gliazellen sowie eine Demyelinisierung (88). Es wurden also glaukomatöse Schäden sowie eine Demyelinisierung durch eine Immunaktivierung und Produktion von gegen retinale Antigene gerichtete Autoantikörper hervorgerufen. B-Gedächtniszellen können bei Zweitkontakt mit ihrem spezifischen Antigen sofort zu antikörperproduzierenden Effektorzellen differenzieren (29, S. 616 ff., 42) und könnten so für die Erhöhung der gewebeschädigenden Autoantikörper verantwortlich sein. In dieser Studie zeigt sich bei Patienten ein tendenziell erhöhter Anteil an B-Gedächtniszellen, welcher nach der Stimulation mit Retinahomogenisat signifikant höher ist als bei Gesunden. Außerdem konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass der Anteil der  $B_{\text{mems}}$  durch die Stimulation mit Retinahomogenisat bei Patienten ansteigt, bei Gesunden hingegen sinkt. Dies könnte auf eine erhöhte B-Zell-Reaktivität auf retinale Antigene bei Glaukumpatienten hindeuten. Interessante Parallelen bezüglich der T-Zellen im Blut von Glaukumpatienten konnten in einer Studie von Yang et al. festgestellt werden (89). T-Zellen von Glaukumpatienten, welche mit einem Proteinlysats aus glaukomatöser Retina stimuliert worden waren, zeigten eine signifikant höhere Proliferationsrate als T-Zellen von Kontrollpersonen nach der gleichen Stimulation. Außerdem herrschte eine inverse Korrelation zwischen der Frequenz von regulatorischen T-Zellen und der Proliferationsrate sowie der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Yang et al. folgerten, dass T-Zellen von Glaukumpatienten möglicherweise eine erhöhte Reaktivität gegenüber retinalen Antigenen zeigen. Außerdem könnte eine veränderte Anzahl von  $T_{\text{regs}}$  ein gestörtes Gleichgewicht des Immunsystems begünstigen und damit möglicherweise eine Rolle bei Neuroinflammation bzw. -degeneration spielen (89). Die hier festgestellte veränderte Immunreaktion bei Kontakt mit retinalen Antigenen könnte bei der Pathogenese des Glaukoms von Bedeutung sein. Der Anstieg der  $B_{\text{mems}}$  bei Erkrankten nach der Stimulation mit Retinahomogenisat, im Gegensatz zum Absinken dieser bei Gesunden, könnte auf eine erhöhte B-Zell-Reaktivität auf retinale Antigene bei Glaukumpatienten hindeuten. Möglicherweise trägt, wie weiter oben beschrieben, die verringerte Anzahl der  $B_{\text{regs}}$  aufgrund einer verminderten Hemmung der  $B_{\text{mems}}$  zur Zunahme dieser bei. Der Anstieg der  $B_{\text{mems}}$  könnte zu einer Erhöhung von gewebeschädigenden Autoantikörpern und dadurch zu Demyelinisierung führen. Wie kürzlich herausgefunden, könnte die Demyelinisierung dem Verlust von Axonen in der Ausbreitung von neurodegenerativen Erkrankungen vorausgehen und dadurch ein Teil der Entstehung des Glaukoms sein.

#### 5.1.2.5 Parallelen bei Rheumatoider Arthritis

Schließlich konnte auch bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) eine interessante Feststellung bezüglich der B-Zell-Subtypen gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein höheres Verhältnis von transitionalen regulatorischen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen nach einer B-Zell-depletierenden Therapie mit einem besseren klinischen Outcome der Patienten korrelierte (131). Zur Behandlung einer

therapierefraktären RA wird der monoklonale Antikörper Rituximab eingesetzt, welcher gegen das Oberflächenantigen CD20 gerichtet ist und damit selektiv B-Zellen lysiert (132). Nach der B-Zell-Depletion kommt es zu einer Repopulation mit B-Zellen, wobei die Fraktion der transitionalen  $B_{regs}$  im Vergleich zum Ausgangspunkt signifikant zunimmt. Patienten mit gutem klinischen Outcome (niedriger Disease Activity Score 28, DAS28) weisen ein signifikant höheres Verhältnis von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  auf, als solche, die nur schlecht auf die B-Zell-depletierende Therapie ansprechen. Es konnte auch gezeigt werden, dass nach der Repopulation die TNF-Produktion stark reduziert ist und dies mit einer Verminderung der B-Gedächtniszellen korreliert. Insgesamt wird also durch die B-Zell-Depletion das Verhältnis der  $B_{regs}$  zu den  $B_{mems}$  und damit das Verhältnis von IL-10- zu TNF- $\alpha$ -produzierenden Zellen zugunsten der regulatorischen B-Zellen hin verändert. Ein hoher Quotient korreliert dabei mit gutem klinischen Outcome (131). Das Gleichgewicht zwischen regulierenden und proinflammatorischen B-Zell-Untergruppen ist also wichtig für den Therapieerfolg.

#### 5.1.2.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Gleichgewicht zwischen regulatorischen B-Zellen, reifen B-Zellen und B-Gedächtniszellen eine Rolle in autoimmunen und neurodegenerativen Krankheiten zu spielen scheint. Aufgrund einer Erniedrigung der Level von  $B_{regs}$  könnte es zum Wegfall der Hemmung von  $B_{mems}$  kommen, was letztlich zur Aktivierung anderer Immunzellen sowie zur Produktion von gewebeschädigenden Autoantikörpern führen kann. Durch eine Erhöhung der proinflammatorisch wirkenden  $B_{mems}$  und eine Erniedrigung von antiinflammatorisch wirkenden  $B_{regs}$  könnte also die Entstehung neurodegenerativer Krankheiten, wie das Glaukom, begünstigt werden. Auf der anderen Seite könnten diese Veränderungen der B-Zell-Zahlen aber auch Ausdruck der im Rahmen dieser Erkrankungen bestehenden chronischen Entzündungsreaktion sein und als Folge davon auftreten. Erkenntnisse zur Wirksamkeit verschiedener Medikamente, die Einfluss auf die Level der B-Zellen nehmen, lassen wiederum B-Zellen als Angriffspunkt möglicher neuer Therapieoptionen für das Glaukom interessant erscheinen. Sollte das verschobene Verhältnis von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  jedoch als Folge der Erkrankung entstehen, könnte es zukünftig als diagnostischer Parameter oder zum Monitoring des Krankheitsverlaufs dienen.

#### 5.1.2.7 B-Zellen bei Patienten mit primärem Winkelblockglaukom

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Yu et al. werden ebenfalls Veränderungen der B-Zell-Level im Blut von Glaukompatienten beschrieben, was die Hypothese, dass B-Zellen eine Rolle bei der Pathogenese des Glaukoms spielen, unterstützt. Die Arbeitsgruppe um Yu et al. nahm, ähnlich wie in dieser Studie, Patienten und gesunden Probanden peripheres Blut ab, aus welchem mittels Dichtegradientenzentrifugation PBMCs isoliert wurden. Die Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmerkmale CD19, CD27, CD38, IgD und CD24 gefärbt und mit einem Durchflusszytometer (BD FACS Canto II) gemessen. Durch die Verwendung von fünf Antikörpern wurden die Zellen durch mehrere Gating-Schritte sortiert und dabei immer wieder Zellen von den nachfolgenden Messungen ausgeschlossen. Im

Gegensatz zu der hier vorgelegten Studie wurden zusätzlich fluoreszenzgekoppelte Antikörper gegen CD27 und IgD verwendet (133).

Ein weiterer Unterschied zu dieser Studie zeigt sich im Probandenkollektiv. In der Studie von Yu et al. wurde zum Großteil das Blut von Patienten, welche an einem primären Winkelblockglaukom (PACG) litten ( $n_{\text{(PACG)}} = 38$ ,  $n_{\text{(POAG)}} = 6$ ), untersucht (133). Dem Winkelblockglaukom liegt im Gegensatz zum Offenwinkelglaukom ein anderer Pathomechanismus zugrunde. Während die glaukomatöse Schädigung beim primären Offenwinkelglaukom überwiegend durch Apoptose der retinalen Ganglienzellen als Folge von unterschiedlichen Faktoren (wie in Abschnitt 2.2 beschrieben) auftritt, liegt dem Winkelblockglaukom eine anatomische beziehungsweise mechanische Ursache zu Grunde (1, 3, S. 354 ff.). Das PACG ist definiert durch das Vorhandensein von iridotrabekulärem Kontakt. Dieser kann aufgrund von Synechien oder sukzessiver Anlagerung neuer Gewebeschichten (Apposition) bestehen. Durch den Kontakt der peripheren Iris mit dem Trabekelmaschenwerk wird der Kammerwinkel verdeckt und die Drainage des Kammerwassers verhindert (1). Diese mechanische Verlegung des Kammerwinkels verursacht einen Augeninnendruckanstieg, welcher zu Papillenschädigungen sowie Gesichtsfeldeinschränkungen führt (6, S. 434 ff.).

Yu et al. fanden bei Glaukompatienten eine signifikante Erhöhung der doppelt negativen B-Gedächtniszellen, welche, wie weiter oben erwähnt, einen gut differenzierten Subtyp der Gedächtniszellen darstellen. Ebenso war die Frequenz von antikörperproduzierenden Plasmablasten bei Patienten signifikant erhöht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie zeigte sich im Patientenkollektiv der Studie von Yu et al. allerdings eine erhöhte Anzahl von  $B_{\text{regs}}$  im Vergleich zu Gesunden (133). Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen könnte auf die verschiedenen Glaukomtypen der in die Studien eingeschlossenen Patienten zurückzuführen sein. Auch wurde teilweise eine andere Kombination an Antikörpern zur Oberflächenmarkierung der B-Zellen verwendet als in der hier vorliegenden Studie. Nichtsdestotrotz weisen die Erkenntnisse beider Studien auf eine mögliche Rolle der B-Zellen bei der Pathogenese des Glaukoms hin und unterstreichen die Wichtigkeit weiterer Untersuchungen bezüglich dieser Immunzellen.

## 5.2 Bedeutung der veränderten Lymphozytenzahlen

Neben den Veränderungen innerhalb der B-Zellen fiel in dieser Studie eine erniedrigte Zahl an Lymphozyten im Blut von Glaukompatienten im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen auf. Da die Gesamtzahl der B-Zellen bei Patienten und Probanden vergleichbar war, muss diese Erniedrigung auf eine andere Zellpopulation innerhalb der Lymphozyten zurückzuführen sein. Dabei kommen T-Zellen sowie NK-Zellen in Frage. Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer-Demenz konnte eine erniedrigte Lymphozytenzahl im peripheren Blut von Patienten festgestellt werden (134, 135). Sowohl T- als auch B-Lymphozyten waren verringert, wobei die Verringerung der T-Lymphozyten vor allem auf eine Erniedrigung der  $CD4^+$  T-Helferzellen zurückzuführen war (134, 135). Auffällig war, dass die erniedrigte Lymphozytenzahl bei Parkinsonpatienten mit einer erhöhten Zahl an  $CD4^+CD25^+$  T-



Zellen invers korrelierte (134). CD25 (auch als IL-2-Rezeptor  $\alpha$  bezeichnet) wird von aktivierten T-Zellen hochreguliert und von regulatorischen T-Zellen exprimiert (29, S. 1100). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD25 von apoptotischen Lymphozyten exprimiert wird (136). Bas et al. folgerten daraus, dass eine erhöhte Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit einer erhöhten Apoptose von Lymphozyten zusammenhängt, wodurch die verringerte Lymphozytenzahl erklärt werden könnte (134). Auch in einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von POAG-Patienten festgestellt werden, was zu dieser Hypothese passen würde (137). Möglicherweise lässt sich die hier festgestellte erniedrigte Lymphozytenzahl bei Glaukumpatienten also durch eine erhöhte Apoptose der T-Zellen erklären. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit nicht die Level der T-Zellen bestimmt, so dass keine sichere Schlussfolgerung bezüglich dieser Zellen getroffen werden kann. Um diese Frage zu beantworten wären weitere Untersuchungen der T-Zellen und deren Untergruppen nötig.

### **5.3 Bedeutung der veränderten Zytokinlevel**

#### **5.3.1 Veränderungen von IL-8 und VEGF-A**

In dieser Studie zeigt sich ein signifikant erhöhtes Level des Zytokins IL-8 sowie ein tendenziell erhöhtes Level von VEGF-A im Serum von Patienten im Vergleich zu Gesunden. IL-8 oder synonym CXCL8 bezeichnet ein proinflammatorisches Chemokin, welches chemotaktisch für Neutrophile, Basophile, T-Zellen und B-Zellen wirkt (28, S. 314). Es wird von Zellen an Infektionsherden sezerniert, wozu Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten, Epithelzellen sowie Endothelzellen gehören. Die Produktion von IL-8 wird unter anderem durch IL-17 stimuliert, welches von T<sub>H</sub>17-Zellen ausgeschüttet wird. IL-8 wirkt mobilisierend und aktivierend auf Neutrophile Granulozyten und fördert deren Degranulation. Außerdem hat es wie VEGF-A angiogenetische Eigenschaften (29, S. 138; 604). Unter VEGF-A versteht man einen Angiogenesefaktor und ein Signalmolekül, welches zur Erweiterung von Gefäßen sowie zur Erhöhung der Permeabilität führt (28, S. 99 f.). Veränderte Level von IL-8 und VEGF-A bei Glaukumpatienten konnten auch in anderen Untersuchungen festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von IL-8 sowohl im Kammerwasser (59, 138) als auch in der Retina (59) von Glaukumpatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen erhöht ist. Dabei zeigte sich die Konzentration bei Patienten mit schwereren Gesichtsfelddefekten sowie jeweils im stärker betroffenen Auge höher (138). Auch für VEGF konnten erhöhte Level im Kammerwasser von Glaukumpatienten nachgewiesen werden (59).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine proinflammatorische Umgebung im Kammerwasser sowie in der Retina von Glaukumpatienten. Gramlich et al. folgern daraus, dass die hochregulierten Level von proinflammatorischen Zytokinen die Homöostase der Retina beeinflussen und so eine Rolle bei der Neurodegeneration spielen könnten (59). Die in dieser Studie gezeigten erhöhten Konzentrationen von IL-

8 und VEGF-A im peripheren Blut von Patienten deuten neben der lokalen proinflammatorischen Umgebung auf eine zusätzliche systemische Entzündungsreaktion hin. Diese könnte, wie in Punkt 5.1.2 beschrieben, zu Veränderungen der Immunzellen, wie einer erhöhten Immunzellendifferenzierung, führen. Allerdings kann anhand dieser Studie nicht differenziert werden, ob die systemischen Veränderungen als Ursache oder als Folge des Glaukoms auftreten.

### 5.3.2 Veränderungen von IL-4

Weiterhin kann in der vorliegenden Studie nach der Stimulation der PBMCs mit CpG/CD40L in den Kulturüberständen bei Patienten ein annähernd doppelt so hohes Level an IL-4 im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden. IL-4 wird vor allem von T<sub>H</sub>2-Zellen sowie von Invarianten Natürlichen Killer-T-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen, Basophilen und ILCs ausgeschüttet (28, S. 314, 31). Aber auch B-Zellen können nach einer Aktivierung durch IL-4-sezernierende T<sub>H</sub>2-Zellen das Zytokin IL-4 produzieren (139, 140). Es bewirkt eine B-Zell-Aktivierung, einen IgE-Klassenwechsel, eine T<sub>H</sub>1-Suppression und eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung (28, S. 314). Mittels IL-4 können sowohl suppressive als auch stimulierende Effekte auf verschiedene Zelltypen ausgeübt werden, wodurch es an der Regulation von unterschiedlichen Signalwegen des Immunsystems beteiligt ist. Nach dem Stand der aktuellen Forschung ist IL-4 ein entzündungsregulierendes Zytokin, welches vor allem antiinflammatorisch wirkt. Allerdings gibt es auch Hinweise auf proinflammatorische Effekte (31). IL-4 kann sowohl zellvermittelte Immunität inhibieren als auch humorale Immunität fördern (31, 141).

In der vorliegenden Studie wurden PBMCs von Patienten und Kontrollpersonen mit CpG und CD40L stimuliert, um die B-Zellen zur Differenzierung zu IL-10-produzierenden regulatorischen B-Zellen anzuregen. CpG diene dabei als TLR9-Ligand der T-Zell-unabhängigen Aktivierung, welche gemeinsam mit CD40L, als T-Zell-abhängigem Signal, zur optimalen Stimulation der B-Zellen führt (44, 140). Während die Aktivierung von TLRs auf Dendritischen Zellen oder Monozyten zu einer proinflammatorischen Antwort führt, werden bei B-Zellen regulatorische Mechanismen ausgelöst, die eine überschießende Immunantwort hemmen sollen (44, 142). Dazu zählt die gesteigerte IL-10-Produktion der B-Zellen durch den TLR9-Liganden CpG (143). Mehrere Studien identifizierten zusätzlich die Interaktion von CD40L und CD40 als essenziell für die Aktivierung von regulatorischen B-Zellen (44, 46, 87). Da CD40 auch auf anderen Zellen exprimiert wird, aktiviert CD40L neben B-Zellen auch Monozyten und Dendritische Zellen (144). Anhand des Versuchsaufbaus der vorliegenden Studie kann nicht sicher unterschieden werden, ob die Stimulation mit CpG und CD40L B-Zellen oder andere in den PBMCs enthaltene Zellen zur Produktion von IL-4 angeregt hat. Dadurch ist eine Interpretation, warum bei Patienten die IL-4-Produktion nach der Stimulation fast doppelt so hoch ist wie bei gesunden Probanden, schwierig. Bezüglich des Glaukoms und IL-4 konnte aber in einer anderen Studie eine interessante Feststellung gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von IL-4 sowie IL-6 im Serum von Glaukmpatienten signifikant höher war als bei Kontrollpersonen (145). Huang et al. vermuten allerdings, dass die erhöhten

Zytokinlevel weniger ursächlich für die Neurodegeneration als vielmehr ein Feedback-Mechanismus des Ganglienzellschadens sind (145). Um die Rolle der veränderten Zytokinlevel besser zu verstehen und einzuordnen, sind weitere Studien nötig. Für die vorliegende Studie lässt sich festhalten, dass die unterschiedlichen Level von IL-4 nach der Stimulation mit CpG/CD40L auf ein verändertes Zusammenspiel der Immunzellen bei Glaukompatienten anders als bei Gesunden hindeuten.

## 5.4 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Bei einigen Ergebnissen der durchflusszytometrischen Messungen, wie auch bei der Bestimmung der Anzahl der  $B_{regs}$ , konnten hohe Standardabweichungen festgestellt werden. Dies deutet auf eine hohe Streuung der Werte und somit auf große interindividuelle Unterschiede der Zellzahlen zwischen den Studienteilnehmern hin. Je größer die Streuung der Stichproben und je kleiner der erwartete Unterschied, desto höher ist die benötigte Fallzahl für eine Studie. Diese Untersuchung lieferte als Pilotstudie bezüglich der regulatorischen B-Zellen im Blut von Glaukompatienten wichtige Informationen zu vermutetem prozentualem Unterschied sowie erwarteter Streuung der Werte. Somit kann anhand dieser Pilotstudie für künftige Studien eine genaue Fallzahlberechnung für die benötigte Probandenzahl durchgeführt und die hier festgestellte Tendenz gegebenenfalls als statistisch signifikanter Unterschied verifiziert werden.

Wie in Abschnitt 5.1.1.1 (Phänotyp der regulatorischen B-Zellen) beschrieben, sind weniger als 20 % der B-Zellen innerhalb der dort genannten Gruppen IL-10-produzierend und damit immunsuppressiv. Die verschiedenen Gruppen werden jeweils anhand des Profils der Oberflächenmerkmale der Zellen definiert. So wurde auch in dieser Studie die Gruppe der transitionalen regulatorischen B-Zellen anhand des Oberflächenprofils  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  gegenüber anderen B-Zellen abgegrenzt und quantifiziert. Allerdings werden durch die Differenzierung anhand der Oberflächenfärbung auch andere, nicht IL-10-produzierende B-Zellen, miterfasst. Daher wäre eine intrazelluläre Färbung des IL-10 eine noch genauere Methode, um diese Zellen zu bestimmen. Trotzdem konnten, wie in den Abschnitten 5.1.1 und 5.1.2 beschrieben, in verschiedenen Erkrankungen Veränderungen der Anzahl und Funktion der  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  transitionalen  $B_{regs}$  festgestellt und wertvolle Rückschlüsse daraus gezogen werden. Auch bezüglich des Glaukoms konnte die Bestimmung dieser Zellen neue Einblicke in die Rolle der B-Zellen bei Pathogenese und möglichen Therapieoptionen aufzeigen.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob eine veränderte Anzahl der regulatorischen B-Zellen ursächlich an der Pathogenese des Glaukoms und anderen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist oder ob diese Veränderungen als Folge dieser Krankheiten auftreten. Da der Großteil der Studien zur Rolle der  $B_{regs}$  im Tiermodell durchgeführt wurden, besteht zur Klärung dieser Frage weiterer Bedarf an Untersuchungen beim Menschen. Wie in Punkt 5.1.2 beschrieben, könnten B-Zellen ein potenzieller Angriffspunkt für neue Therapieoptionen des Glaukoms darstellen oder als diagnostischer Parameter dienen. Dazu wären weitere Studien zur Rolle des

Gleichgewichts der B-Zell-Subtypen sowie zu der Frage, ob eine Erhöhung des Verhältnisses von  $B_{\text{regs}}$  zu  $B_{\text{mems}}$  einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf des Glaukoms haben könnte, nötig. In diesem Zuge könnte eine mögliche Wirksamkeit immunmodulatorischer Medikamente, welche einen Einfluss auf die B-Zell-Level haben, untersucht werden.

In den Microarray-Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Vergleichspersonen in den Leveln der von regulatorischen B-Zellen sezernierten Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$  festgestellt werden, was nicht den Erwartungen entsprach. Es zeigte sich bei der Analyse der Messergebnisse, dass bei verschiedenen Zytokinen, wie beispielsweise HMGB1, die gemessenen Werte an der unteren Nachweisgrenze der Messmethode lagen. Auch war bei einigen Proben kein Zytokin nachweisbar, was an den verringerten Anzahlen der gültigen Ergebnisse deutlich wurde. Daher war möglicherweise die Untersuchung der Zytokinlevel mittels Antikörper-Microarray nicht die richtige Wahl für diesen Versuchsaufbau. Auch könnte ein nicht feststellbarer Unterschied an einer zu kleinen Stichprobengröße liegen. Bei geringen Unterschieden wäre eine größere Stichprobe nötig, um diese aufzudecken. Somit würde eventuell eine sensitivere Nachweismethode oder eine größere Stichprobe das erwartete Ergebnis aufdecken.

## 6 Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte als Pilot-Studie die Anzahl der regulatorischen B-Zellen und deren Zytokine im peripheren Blut von Glaukompatienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe. Dabei konnten Veränderungen der Anzahlen der B-Zell-Untergruppen, der Lymphozytenzahlen sowie der Konzentrationen verschiedener Zytokine im Blut von Glaukompatienten festgestellt werden. Der Anteil der regulatorischen B-Zellen war bei Glaukompatienten tendenziell niedriger als bei gesunden Probanden. Bei den B-Gedächtniszellen verhielt es sich umgekehrt, der Anteil der  $B_{\text{mems}}$  war bei Erkrankten tendenziell höher als bei Gesunden. Interessanterweise konnte bei Glaukompatienten ein signifikant erniedrigtes Verhältnis von  $B_{\text{regs}}$  zu  $B_{\text{mems}}$  im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden. Auch bezüglich des Verhältnisses von reifen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Zusätzlich fiel eine erniedrigte Zahl an Lymphozyten im Blut von Glaukompatienten im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen auf. Weiterhin konnten in den Zytokinleveln Unterschiede zwischen Glaukompatienten und gesunden Probanden festgestellt werden. So zeigte sich das Level von IL-8 im Serum von Patienten signifikant erhöht im Gegensatz zu dem bei Gesunden. Das Level von VEGF-A im peripheren Blut war bei POAG-Patienten ebenfalls tendenziell höher als in der Vergleichsgruppe. Nach der Stimulation mit CpG/CD40L konnte in den Kulturüberständen bei Patienten ein annähernd doppelt so hohes Level an IL-4 festgestellt werden wie bei gesunden Probanden.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine veränderte Immunantwort des adaptiven Immunsystems sowie eine chronische systemische Entzündungsreaktion bei Glaukompatienten hin.  $B_{\text{regs}}$  hemmen eine exzessive Immunantwort und wirken insbesondere durch die Ausschüttung von IL-10 immunregulierend. Sie inhibieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch  $CD4^+$  T-Zellen, die Differenzierung von naiven T-Zellen zu  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen und induzieren die Umwandlung von  $CD4^+$  T-Zellen zu  $T_{\text{regs}}$ . B-Gedächtniszellen hingegen sind unter den B-Zellen für den Großteil der sezernierten proinflammatorischen Zytokine Lymphotoxin und TNF- $\alpha$  verantwortlich und können schnell zu antikörperproduzierenden Plasmablasten differenzieren. Ein Erklärungsansatz für das veränderte Verhältnis der oben genannten Zellen ist, dass das erniedrigte Level der immunsuppressiven  $B_{\text{regs}}$  zu einer Erhöhung der proinflammatorischen  $B_{\text{mems}}$  führt. Dies könnte folglich eine gesteigerte Entzündungsreaktion und eine damit verbundene Schädigung von Geweben, wie der Retina, bedingen. Das hier festgestellte Ungleichgewicht von  $B_{\text{regs}}$  zu  $B_{\text{mems}}$  konnte auch bei anderen neurodegenerativen und autoimmunen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Demenz, der MS, der ITP, der MOG-Ab-assoziierte Erkrankung sowie der RA, nachgewiesen werden. Es lässt sich nicht sicher feststellen, ob die Verringerung der  $B_{\text{regs}}$  und deren immunsuppressiven Wirkung zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion und einer damit verbundenen Schädigung von Geweben führt. Oder aber, ob die verminderte Anzahl und eingeschränkte Funktion der  $B_{\text{regs}}$  eine Konsequenz der chronischen Entzündungsreaktion bei autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen ist.

Hinweise für eine ursächliche Beteiligung der  $B_{regs}$  an der Pathogenese dieser Erkrankungen bieten Erkenntnisse zu Medikamenten, welche Einfluss auf die Level der B-Zellen nehmen und wirksam bei Krankheiten wie der MS, der ITP sowie der RA eingesetzt werden. Eine Erhöhung des Verhältnisses von  $B_{regs}$  zu  $B_{mems}$  führt dabei durch eine Reduktion des Progressionsrisikos zum Therapieerfolg und ist mit einem positiven klinischen Outcome assoziiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Gleichgewicht zwischen regulatorischen B-Zellen, reifen B-Zellen und B-Gedächtniszellen eine Rolle in autoimmunen und neurodegenerativen Krankheiten zu spielen scheint. Möglicherweise begünstigt ein Ungleichgewicht von regulatorischen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen die Entstehung oder das Fortschreiten von Neurodegeneration und könnte so an der Entstehung des Glaukomschadens beteiligt sein. Insbesondere die Erkenntnisse zur erfolgreichen Therapie autoimmuner und neurodegenerativer Erkrankungen durch den Einsatz von Medikamenten, die die Level der verschiedenen B-Zellen beeinflussen, lassen diese als vielversprechenden Angriffspunkt möglicher neuer Glaukomtherapien erscheinen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 2: Classification and terminology Supported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 2 Classification and Terminology. Br J Ophthalmol. 2017;101(5):73-127.
2. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. Ophthalmology. 2014;121(11):2081-90.
3. Bowling B. Kanskis Klinische Ophthalmologie : ein systematischer Ansatz. 8. Auflage ed. München 2017.
4. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 3: Treatment principles and options Supported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 3 Treatment principles and options. Br J Ophthalmol. 2017;101(6):130-95.
5. Pape H-C, Silbernagl S, Klinke R, Rothenburger A, Kurtz A, Brenner B, et al. Physiologie. In: Pape H-C, Silbernagl S, Kurtz A, editors. 8. unveränderte Auflage ed. Stuttgart 2018.
6. Grehn F. Augenheilkunde [E-Book]. 32nd ed. 2019 ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH; 2019.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Kopf, Hals und Neuroanatomie. Prometheus : LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke ; Erik Schulte ; Udo Schumacher Ill von Markus Voll 3., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart 2018.
8. Talos, colorized by Jakov. Anatomie des Auges [Internet]: copied from German Wikipedia; 2008 [zitiert am 26.08.2021]. URL: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3321021>.
9. Peter Hartmann, edited by Marc Gabriel Schmid. Schichten und Zelltypen der Säugetierretina [Internet]: de.wikipedia; 2013 [zitiert am 26.08.2021]. URL: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/67/Retina\\_layers.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/67/Retina_layers.svg).
10. Benhar I, London A, Schwartz M. The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. Front Immunol. 2012;3:296.
11. Bell K, Gramlich OW, Von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Beck S, Funke S, Wilding C, et al. Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma? Progress in retinal and eye research. 2013;36:199-216.
12. Zhou R, Caspi RR. Ocular immune privilege. F1000 Biol Rep. 2010;2.
13. Forrester JV, Xu H. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. Front Immunol. 2012;3:338.
14. Cousins SW, Trattler WB, Streilein JW. Immune privilege and suppression of immunogenic inflammation in the anterior chamber of the eye. Current eye research. 1991;10(4):287-97.
15. Mochizuki M, Sugita S, Ishikawa N, Watanabe T. Immunoregulation by aqueous humor. Cornea. 2000;19(3 Suppl):S24-5.
16. Taylor AW, Streilein JW, Cousins SW. Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor. Current eye research. 1992;11(12):1199-206.
17. Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. J Leukoc Biol. 2003;74(2):179-85.

18. Caspi RR. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev.* 2006;213:23-35.
19. Prendergast RA, Iliff CE, Coskuncan NM, Caspi RR, Sartani G, Tarrant TK, et al. T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(5):754-62.
20. Xu H, Manivannan A, Liversidge J, Sharp PF, Forrester JV, Crane IJ. Requirements for passage of T lymphocytes across non-inflamed retinal microvessels. *J Neuroimmunol.* 2003;142(1-2):47-57.
21. Zhou R, Horai R, Mattapallil MJ, Caspi RR. A new look at immune privilege of the eye: dual role for the vision-related molecule retinoic acid. *Journal of immunology.* 2011;187(8):4170-7.
22. Bell K, von Thun und Hohenstein-Blaul N, Teister J, Grus FH. Modulation of the Immune System for the Treatment of Glaucoma. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(7):942-58.
23. Bell K, Funke S, Grus FH. [Autoimmunity and glaucoma]. *Ophthalmologe.* 2019;116(1):18-27.
24. Osborne NN. Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Prog Brain Res.* 2008;173:339-52.
25. Ito Y, Shimazawa M, Inokuchi Y, Yamanaka H, Tsuruma K, Imamura K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model. *Eur J Neurosci.* 2011;33(5):843-55.
26. Benoist d'Azy C, Pereira B, Chiambaretta F, Dutheil F. Oxidative and Anti-Oxidative Stress Markers in Chronic Glaucoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS one.* 2016;11(12):e0166915.
27. Rink L. *Immunologie für Einsteiger [E-Book]*. 2nd ed. 2015 ed. Kruse A, Haase H, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2015.
28. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie [E-Book]*. 4 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2019.
29. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9th ed. 2018 ed. Berlin, Heidelberg: 2018.
30. Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2018;22(3):263-77.
31. Dong C, Fu T, Ji J, Li Z, Gu Z. The role of interleukin-4 in rheumatic diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(8):747-54.
32. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2017;127(3):772-9.
33. Matsushita T. Regulatory and effector B cells: Friends or foes? *J Dermatol Sci.* 2019;93(1):2-7.
34. Taurone S, Ripandelli G, Pacella E, Bianchi E, Plateroti AM, De Vito S, et al. Potential regulatory molecules in the human trabecular meshwork of patients with glaucoma: immunohistochemical profile of a number of inflammatory cytokines. *Mol Med Rep.* 2015;11(2):1384-90.
35. Agarwal P, Daher AM, Agarwal R. Aqueous humor TGF- $\beta$ 2 levels in patients with open-angle glaucoma: A meta-analysis. *Mol Vis.* 2015;21:612-20.



36. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
37. Georgiev P, Charbonnier LM, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol*. 2019;39(7):623-40.
38. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol*. 2019;10:2458.
39. Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front Immunol*. 2018;9:2285.
40. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*. 2004;197:179-91.
41. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.
42. Seifert M, Küppers R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016;30(12):2283-92.
43. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2007;178(10):6092-9.
44. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221-41.
45. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;184(6):2271-8.
46. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944-50.
47. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *Journal of immunology*. 2011;186(10):5569-79.
48. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine*. 2013;5(173):173ra23.
49. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *International immunology*. 2015;27(10):479-86.
50. Grus FH, Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Wax MB. Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(3):968-76.
51. Yang J, Tezel G, Patil RV, Romano C, Wax MB. Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(6):1273-6.
52. Joachim SC, Reichelt J, Berneiser S, Pfeiffer N, Grus FH. Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;46(4):573-80.
53. Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Grus FH. Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal

tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor. *Current eye research*. 2007;32(6):501-9.

54. von Thun und Hohenstein-Blaul N, Kunst S, Pfeiffer N, Grus FH. [Basic biochemical processes in glaucoma progression]. *Ophthalmologie*. 2015;112(5):395-401.

55. Meriggioli MN. Myasthenia gravis with anti-acetylcholine receptor antibodies. *Front Neurol Neurosci*. 2009;26:94-108.

56. Wilding C, Bell K, Beck S, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH.  $\gamma$ -Synuclein antibodies have neuroprotective potential on neuroretinal cells via proteins of the mitochondrial apoptosis pathway. *PloS one*. 2014;9(3):e90737.

57. Bell K, Wilding C, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH. Protective effect of 14-3-3 antibodies on stressed neuroretinal cells via the mitochondrial apoptosis pathway. *BMC Ophthalmol*. 2015;15:64.

58. Bell K, Wilding C, Funke S, Perumal N, Beck S, Wolters D, et al. Neuroprotective effects of antibodies on retinal ganglion cells in an adolescent retina organ culture. *Journal of neurochemistry*. 2016;139(2):256-69.

59. Gramlich OW, Beck S, von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Boehm N, Ziegler A, Vetter JM, et al. Enhanced insight into the autoimmune component of glaucoma: IgG autoantibody accumulation and pro-inflammatory conditions in human glaucomatous retina. *PloS one*. 2013;8(2):e57557.

60. Joachim SC, Wax MB, Seidel P, Pfeiffer N, Grus FH. Enhanced characterization of serum autoantibody reactivity following HSP 60 immunization in a rat model of experimental autoimmune glaucoma. *Current eye research*. 2010;35(10):900-8.

61. Gramlich OW, Joachim SC, Gottschling PF, Laspas P, Cuny CS, Pfeiffer N, et al. Ophthalmopathology in rats with MBP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(7):1009-20.

62. Joachim SC, Gramlich OW, Laspas P, Schmid H, Beck S, von Pein HD, et al. Retinal ganglion cell loss is accompanied by antibody depositions and increased levels of microglia after immunization with retinal antigens. *PloS one*. 2012;7(7):e40616.

63. Beutgen VM, Schmelter C, Pfeiffer N, Grus FH. Autoantigens in the trabecular meshwork and glaucoma-specific alterations in the natural autoantibody repertoire. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(3):e01101.

64. Beutgen VM, Pfeiffer N, Grus FH. Serological Levels of Anti-clathrin Antibodies Are Decreased in Patients With Pseudoexfoliation Glaucoma. *Front Immunol*. 2021;12:616421.

65. Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(1):175-82.

66. Yang XJ, Ge J, Zhuo YH. Role of mitochondria in the pathogenesis and treatment of glaucoma. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(22):4358-65.

67. Osborne NN, Núñez-Álvarez C, Joglar B, Del Olmo-Aguado S. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur J Pharmacol*. 2016;787:127-33.

68. Bell K, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH. Serum and antibodies of glaucoma patients lead to changes in the proteome, especially cell regulatory proteins, in retinal cells. *PloS one*. 2012;7(10):e46910.

69. Auler N, Tonner H, Pfeiffer N, Grus FH. Antibody and Protein Profiles in Glaucoma: Screening of Biomarkers and Identification of Signaling Pathways. *Biology* (Basel). 2021;10(12).
70. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.
71. Banko Z, Pozsgay J, Gati T, Rojkovich B, Ujfalussy I, Sarmay G. Regulatory B cells in rheumatoid arthritis: Alterations in patients receiving anti-TNF therapy. *Clinical immunology* (Orlando, Fla). 2017.
72. Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol*. 2011;239(1-2):80-6.
73. Hodapp E, Parrish RK, Anderson DR. *Clinical decisions in glaucoma*. St. Louis, Mo.: Mosby; 1993.
74. Susanna R, Jr., Vessani RM. Staging glaucoma patient: why and how? *Open Ophthalmol J*. 2009;3:59-64.
75. Racette L, Fischer M, Bebie H, Holló G, Johnson CA, Matsumoto C. VISUAL FIELD DIGEST  
A guide to perimetry and the Octopus perimeter [E-Book]. Köniz, Switzerland: Haag-Streit AG; 2018.
76. Sarstedt. Optimierte Zentrifugationsbedingungen für S-Monovetten [Internet] 2019 [zitiert am 05.12.2019]. URL: [https://www.sarstedt.com/fileadmin/user\\_upload/99\\_Broschueren/NEU/780/10\\_780\\_0400\\_100\\_zentrifugationsbedingungen\\_s\\_monovette\\_0119.pdf](https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/NEU/780/10_780_0400_100_zentrifugationsbedingungen_s_monovette_0119.pdf).
77. Sarstedt. Tipps & Tricks in der Präanalytik [Internet] 2018 [zitiert am 05.12.2019]. URL: [https://www.sarstedt.com/fileadmin/user\\_upload/99\\_Broschueren/NEU/453/10\\_453\\_0100\\_100\\_tipps\\_tricks\\_0119.pdf](https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/NEU/453/10_453_0100_100_tipps_tricks_0119.pdf).
78. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie* [E-Book]. Berlin: Springer-Verlag; 2014.
79. GE-Healthcare. Isolation of mononuclear cells: Methodology and applications [Internet] 2014 [updated 08/2014; zitiert am 04.02.2020]. URL: <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=16156>.
80. FabianK. Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers, hier mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und vier Fluoreszenzkanälen [Internet] 2012 [zitiert am 29.06.2021]. URL: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Duchflusszytometer.png>.
81. Life\_Technologies. Fluorescence SpectraViewer [Internet] 2020 [zitiert am 14.02.2020]. URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
82. BDBiosciences. BD CellQuest™ Pro Software Acquisition Tutorial [Internet] 2020 [zitiert am 17.02.2020]. URL: [https://www.bdbiosciences.com/documents/14\\_cellquest\\_prosoft\\_acquisit.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/14_cellquest_prosoft_acquisit.pdf).
83. Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker PD, Chana P, Elgueta R, Dodd PC, et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. *Sci Rep*. 2016;6:20044.

84. Banko Z, Pozsgay J, Szili D, Toth M, Gati T, Nagy G, et al. Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. *Journal of immunology*. 2017;198(4):1512-20.
85. Daïen CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(8):2037-46.
86. Marasco E, Farroni C, Cascioli S, Marcellini V, Scarsella M, Giorda E, et al. B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subsets and identifies specific defects in immunodeficient patients. *European journal of immunology*. 2017;47(1):131-43.
87. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*. 2003;197(4):489-501.
88. Laspas P, Gramlich OW, Müller HD, Cuny CS, Gottschling PF, Pfeiffer N, et al. Autoreactive antibodies and loss of retinal ganglion cells in rats induced by immunization with ocular antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8835-48.
89. Yang X, Zeng Q, Göktas E, Gopal K, Al-Aswad L, Blumberg DM, et al. T-Lymphocyte Subset Distribution and Activity in Patients With Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(4):877-88.
90. Tezel G, Yang X, Luo C, Cai J, Kain AD, Powell DW, et al. Hemoglobin expression and regulation in glaucoma: insights into retinal ganglion cell oxygenation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(2):907-19.
91. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics [E-Book]*. Experimentator. 7th ed. 2016 ed. Berlin, Heidelberg 2016.
92. Schmelter C, Fomo KN, Perumal N, Manicam C, Bell K, Pfeiffer N, et al. Synthetic Polyclonal-Derived CDR Peptides as an Innovative Strategy in Glaucoma Therapy. *J Clin Med*. 2019;8(8).
93. ThermoFisherScientific, Inc. Zeba™ Spin Desalting Plate [Internet] 2011 [zitiert am 28.07.2021]. URL: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011564\\_Zeba\\_Spin\\_Desalt\\_Plate\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIFpYmEgU3BpbjBEZXNhbHRpbmVmcGUGxhdGU=](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011564_Zeba_Spin_Desalt_Plate_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIFpYmEgU3BpbjBEZXNhbHRpbmVmcGUGxhdGU=).
94. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 161-7.
95. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(2):271-9.
96. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41.
97. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res*. 2013;73(8):2468-79.
98. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1204-12.
99. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-51.

100. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 2011;36(3-4):228-38.
101. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of immunology.* 2012;189(8):3925-35.
102. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- $\beta$ /IDO production in a CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun.* 2015;59:53-60.
103. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507(7492):366-70.
104. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med.* 2014;20(6):633-41.
105. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg David A, Jury Elizabeth C, Mauri C. Lipid-Antigen Presentation by CD1d+ B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells. *Immunity.* 2012;36(3):477-90.
106. Schubert RD, Hu Y, Kumar G, Szeto S, Abraham P, Winderl J, et al. IFN- $\beta$  treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity. *Journal of immunology.* 2015;194(5):2110-6.
107. Carter NA, Rosser EC, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):R32.
108. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3420-30.
109. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 production. *Nat Med.* 2014;20(11):1334-9.
110. Sabatino JJ, Jr., Probstel AK, Zamvil SS. B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(12):728-45.
111. Bulati M, Buffa S, Martorana A, Gervasi F, Camarda C, Azzarello DM, et al. Double negative (IgG+IgD-CD27-) B cells are increased in a cohort of moderate-severe Alzheimer's disease patients and show a pro-inflammatory trafficking receptor phenotype. *J Alzheimers Dis.* 2015;44(4):1241-51.
112. Reale M, Iarlori C, Feliciani C, Gambi D. Peripheral chemokine receptors, their ligands, cytokines and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008;14(2):147-59.
113. Pellicanò M, Larbi A, Goldeck D, Colonna-Romano G, Buffa S, Bulati M, et al. Immune profiling of Alzheimer patients. *J Neuroimmunol.* 2012;242(1-2):52-9.
114. Karahan M, Kilic D, Guven S. Systemic inflammation in both open-angle and angle-closure glaucoma: role of platelet-to-lymphocyte ratio. *Bratisl Lek Listy.* 2021;122(1):45-8.
115. Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mukanova U, Yessirkepov M, Kitas GD. The Platelet-to-Lymphocyte Ratio as an Inflammatory Marker in Rheumatic Diseases. *Ann Lab Med.* 2019;39(4):345-57.

116. Guerrier T, Labalette M, Launay D, Lee-Chang C, Outteryck O, Lefèvre G, et al. Proinflammatory B-cell profile in the early phases of MS predicts an active disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(2):e431.
117. Sergott RC, Bennett JL, Rieckmann P, Montalban X, Mikol D, Freudensprung U, et al. ATON: results from a Phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacicept in patients with optic neuritis. *J Neurol Sci*. 2015;351(1-2):174-8.
118. Kappos L, Hartung HP, Freedman MS, Boyko A, Radu EW, Mikol DD, et al. Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(4):353-63.
119. Tak PP, Thurlings RM, Rossier C, Nestorov I, Dimic A, Mircetic V, et al. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated-dose study. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):61-72.
120. Yang M, Sun L, Wang S, Ko KH, Xu H, Zheng BJ, et al. Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *Journal of immunology*. 2010;184(7):3321-5.
121. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013(5):Cd002127.
122. Fang J, Lin L, Lin D, Zhang R, Liu X, Wang D, et al. The imbalance between regulatory memory B cells reveals possible pathogenesis involvement in pediatric immune thrombocytopenia. *Hematology*. 2019;24(1):473-9.
123. Dörner T. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J Rheumatol Suppl*. 2006;77:3-11.
124. Relkin NR, Thomas RG, Rissman RA, Brewer JB, Rafii MS, van Dyck CH, et al. A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease. *Neurology*. 2017;88(18):1768-75.
125. Dodel R, Neff F, Noelker C, Pul R, Du Y, Bacher M, et al. Intravenous immunoglobulins as a treatment for Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *Drugs*. 2010;70(5):513-28.
126. Bayry J, Misra N, Dasgupta S, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Natural autoantibodies: immune homeostasis and therapeutic intervention. *Expert Rev Clin Immunol*. 2005;1(2):213-22.
127. Lünemann JD, Nimmerjahn F, Dalakas MC. Intravenous immunoglobulin in neurology--mode of action and clinical efficacy. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(2):80-9.
128. Li X, Wang L, Zhou L, Zhang Bao J, Miao MZ, Lu C, et al. The imbalance between regulatory and memory B cells accompanied by an increased number of circulating T-follicular helper cells in MOG-antibody-associated demyelination. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;36:101397.
129. Rosenthal JF, Hoffman BM, Tyor WR. CNS inflammatory demyelinating disorders: MS, NMOSD and MOG antibody associated disease. *J Investig Med*. 2020;68(2):321-30.
130. You Y, Joseph C, Wang C, Gupta V, Liu S, Yiannikas C, et al. Demyelination precedes axonal loss in the transneuronal spread of human neurodegenerative disease. *Brain*. 2019;142(2):426-42.
131. Adlowitz DG, Barnard J, Biear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, et al. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PloS one*. 2015;10(6):e0128269.

132. Lopez-Olivo MA, Amezaga Urruela M, McGahan L, Pollono EN, Suarez-Almazor ME. Rituximab for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;1:Cd007356.
133. Yu L, Chen Y, Xu X, Dong Q, Xiu W, Chen Q, et al. Alterations in Peripheral B Cell Subsets Correlate with the Disease Severity of Human Glaucoma. *J Inflamm Res.* 2021;14:4827-4838.
134. Bas J, Calopa M, Mestre M, Mollevi DG, Cutillas B, Ambrosio S, et al. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol.* 2001;113(1):146-52.
135. Busse M, Michler E, von Hoff F, Dobrowolny H, Hartig R, Frodl T, et al. Alterations in the Peripheral Immune System in Dementia. *J Alzheimers Dis.* 2017;58(4):1303-13.
136. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. Upregulation of surface markers on dying thymocytes. *J Exp Med.* 1995;181(2):649-55.
137. Bell K, Holz A, Ludwig K, Pfeiffer N, Grus FH. Elevated Regulatory T Cell Levels in Glaucoma Patients in Comparison to Healthy Controls. *Current eye research.* 2017;42(4):562-7.
138. Kuchtey J, Rezaei KA, Jaru-Ampornpan P, Sternberg P, Jr., Kuchtey RW. Multiplex cytokine analysis reveals elevated concentration of interleukin-8 in glaucomatous aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(12):6441-7.
139. Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *Journal of immunology.* 2005;175(11):7103-7.
140. Gray D, Gray M, Barr T. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(12):3304-10.
141. Harada Y, Tanaka S, Motomura Y, Harada Y, Ohno S, Ohno S, et al. The 3' enhancer CNS2 is a critical regulator of interleukin-4-mediated humoral immunity in follicular helper T cells. *Immunity.* 2012;36(2):188-200.
142. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderón Gómez E, Sweenie CH, et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of immunology.* 2008;180(7):4763-73.
143. Barr TA, Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(11):3040-53.
144. Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;141:92-103.
145. Huang P, Qi Y, Xu YS, Liu J, Liao D, Zhang SS, et al. Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma. *J Glaucoma.* 2010;19(5):324-30.

## **8 Danksagung**



## 9 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Felicitas Teresa Holley
Geburtsdatum/-ort	23.05.1995 in München
Familienstand	ledig

### Studium und Ausbildung

Seit November 2022	Assistenzärztin an der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz
2021 - 2022	Assistenzärztin an der Augenklinik des Klinikums Darmstadt
Mai 2021	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2020 - 2021	Praktisches Jahr an den Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden
Oktober 2019	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2017	Beginn der klinisch-experimentellen Doktorarbeit: „Untersuchung regulatorischer B-Zellen und deren Zytokine im peripheren Blut von Glaukoma-Patienten“ in der Experimentellen Ophthalmologie der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz
April 2016	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2014	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2014 - 2015	Ausbildung zur Rettungssanitäterin am Lehrinstitut für präklinische Rettungsmedizin München
Juni 2013	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Neubiberg

### Praktika

März 2019	Famulatur in der Hausarztpraxis MEDICI Wiesbaden
September 2018	Famulatur in der Notaufnahme des staatlichen Krankenhauses „Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores al Servicio de los Poderes del Estado de Puebla“ (ISSSTEP) in Puebla, Mexiko
August 2017	Hospitation in der Augenklinik des Klinikums Darmstadt
März - April 2017	Famulatur in der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz
August - September 2016	Famulatur auf der internistischen Station der Helios Klinik München Perlach
August - November 2013	Dreimonatiges Pflegepraktikum auf der chirurgischen Station der Helios Klinik München Perlach