

**Abschlussbericht 2023/2024 für das Promotionsstipendium der Roland-
Ernst-Stiftung für Gesundheitswesen**

**Biobanking von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) und extraanalytische
Einflussfaktoren auf das Biobanking von PBMC**

Einführung

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC [peripheral blood mononuclear cells]) sind Blutzellen mit einem einzigen runden Zellkern (z.B. Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen). Sie werden durch Anreicherungsverfahren (z.B. Dichtegradientenzentrifugation) aus Vollblut isoliert und so von den kernlosen (Erythrozyten) und polymorphkernigen Zellen (Granulozyten) sowie dem Plasma (inkl. Thrombozyten) abgetrennt. PBMC spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Immunsystem, z.B. bei der Bekämpfung von Infektionen und Krebs-Erkrankungen oder bei Autoimmunerkrankungen.¹⁻³ Daher sind PBMC für die Erforschung von Krankheitsursachen von immenser und stetig wachsender Bedeutung.

In diesem Zusammenhang ist die Kryokonservierung von PBMC essentiell, da im Forschungs- bzw. Studienkontext eine sofortige Analyse der PBMC häufig nicht möglich bzw. impraktikabel ist. Das standardisierte und qualitätsgesicherte Biobanking ermöglicht die Sammlung und Aufbewahrung der PBMC für zukünftige Analysen in einem zentralen Labor unter gleichen, qualitätskontrollierten Bedingungen, wodurch beeinflussende Unsicherheitskomponenten wie die Inter-Labor- und Inter-Assay-Variabilität minimiert werden. Das Biobanking umfasst eine Abfolge zahlreicher qualitätsbeeinflussender Schritte: (I) präanalytische Prozesse wie Blutentnahme und Probentransport, (II) die Verarbeitung der Proben (z.B. PBMC-Isolation, Aliquotierung), (III) die Kryokonservierung und -lagerung der Proben und (IV) die Bereitstellung und Verteilung der Proben inkl. ggf. Versand zum Anwender bzw. Analytiklabor. Für nachfolgende wissenschaftliche Untersuchungen sind vitale und funktionell intakte PBMC in ausreichender Anzahl eine unabdingbare Voraussetzung. Die Anzahl, Vitalität und insbesondere Funktion der PBMC können jedoch durch zahlreiche Faktoren kritisch beeinflusst werden.^{4,5} In der präanalytischen Phase spielen z.B. das Blutentnahmesystem inkl. Antikoagulans sowie die Temperatur (z.B. während des Transports) und Dauer bis zur Bearbeitung eine entscheidende Rolle. Während der (häufig manuell mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführten) PBMC-Isolation können z.B. die Erfahrung des durchführenden Personals, verwendete Trennmedien und -gefäße, die Temperatur sowie Zentrifugations- und Waschschrte kritischen Einfluss nehmen. Für die Kryokonservierung und -lagerung sind Faktoren wie das verwendete Kryomedium mit ggf. Zusätzen, die PBMC-Konzentration, die Einfrierrate sowie die Lagerungstemperatur und -dauer bedeutsam. In der Auftauphase können schließlich Faktoren wie die Auftautemperatur und -dauer sowie eine anschließende PBMC-Ruhezeit Einfluss auf nachfolgende funktionelle Anwendungen haben. Die Biobanking-Prozesse sind innerhalb einer Biobank in der Regel sehr gut dokumentiert, validiert und kontinuierlich überwacht. Um allerdings über verschiedene Biobanken hinweg (z.B. im Rahmen multi-zentrischer Studien oder in Netzwerken) vergleichbare PBMC-Proben auf höchstem Qualitätsniveau bereitstellen zu können, sind neben internen Qualitätssicherungsmaßnahmen auch externe Vergleichs- und Bewertungsprogramme (Eignungsprüfungen) zwischen den Biobanken unverzichtbar. In diesem Zusammenhang bieten die International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) in Zusammenarbeit mit der Integrated Biobank of Luxembourg (IBBL) ein internationales Vergleichsprogramm zur Isolation vitaler PBMC an. Das IBBL-Programm betrachtet hierbei als Qualitätskenngrößen die PBMC-Anzahl (Leukozyten), ihre Vitalität sowie die T-Zell-Funktion anhand der Bestimmung des Zytokins Interferon- γ . Weitergehende Untersuchungen bspw. Zur Immunphänotypisierung werden nicht angeboten. Obwohl dringend benötigt, sind alternative nationale Eignungsprüfungsprogramme (Ringversuche) für PBMC-Isolation und -Biobanking derzeit nicht verfügbar.

Zielsetzung und methodische Grundlagen

Das primäre Ziel dieses Projekts ist die Schaffung erweiterter struktureller und methodischer Voraussetzungen zur regelmäßigen (externen) Qualitätsüberwachung des Biobankings von PBMC für funktionelle Anwendungen.

Folgende Punkte sollen im Rahmen des Projekts bearbeitet werden:

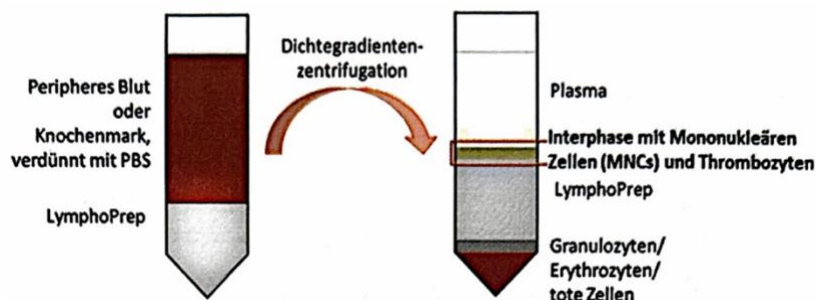
- (1) Bestimmung der PBMC-Vitalität, -Anzahl und -Zusammensetzung
- (2) Bestimmung der PBMC-Funktion
- (3) Abschätzung des Einflusses extra-analytischer Faktoren auf die PBMC-Qualität
- (4) Etablierung von Qualitätskriterien für künftige PBMC-Ringversuche

Als Basis der Bestimmung der absoluten Zellzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten dient das Blutbild am Hämatologieautomaten *Sysmex XN9000*. Die Vitalitätsbestimmung und die Differenzierung der Leukozyten in die relevanten Subpopulationen erfolgt mittels Durchflusszytometrie am *BD FACSLyric* mit entsprechendem Antikörperpanel. Die Differenzierung erfolgt anhand von zellulären Oberflächenmerkmalen, sogenannten *Cluster of Differentiation*. Die Bestimmung der Vitalität im Durchflusszytometer erfolgt mittels Lebend-Tot-Färbung mit 7-AAD. Die Bestimmung der PBMC-Funktion betrachtet die Fähigkeit der Zellen, nach Stimulation Zytokine (wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor (TNF- α), Interleukin 10 (IL-10)) zu produzieren. Die Bestimmung der Zytokine erfolgt mittels Durchflusszytometrie am *BD FACSLyric* nach intrazellulärer Färbung (ICS [intracellular staining]) mit einem entsprechend optimierten Antikörperpanel.

Die Isolation der PBMC aus Spenderblut erfolgt manuell mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Gewinnung der PBMC erfolgt mithilfe der Trennlösung *LymphoPrep*. Diese ermöglicht eine Auftrennung der verschiedenen Zellfraktionen nach der jeweiligen Dichtezone. Die Dichte der *LymphoPrep*-Lösung (1,077 g/ml) ist höher als die Dichte von Monozyten und Lymphozyten (1,059-1,075 g/ml), aber niedriger als die Dichte von Erythrozyten und Granulozyten (1,080-1,110 g/ml). Dadurch bilden sich nach Zentrifugation deutlich von einander zu unterscheidende Schichten aus.

Der allgemeine Isolierungsablauf ist wie folgt:

- (1) Vorlage der *LymphoPrep* im Zentrifugenröhrchen
- (2) langsames vorsichtiges Überschichten mit verdünntem Blut
- (3) Trennung der Zellfraktionen durch Dichtegradientenzentrifugation
- (4) Vorsichtige Abnahme der Interphase mit den PBMC (weiße Schicht zwischen Plasma und Trennlösung)
- (5) Waschen der PBMC in Pufferlösung (DPBS)



Anschließend erfolgt die Kryokonservierung der PBMC, nach Überführung in das Kryomedium, in der Gasphase von Flüssigstickstoff.

Ergebnisse Stand September 2024

Im vergangenen Jahr wurden folgende Durchflusszytometrie-Verfahren getestet und als Methoden (teilweise) etabliert:

- Exp. 1: Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der PBMC (Leukozytensubpopulationen: T-Zellen, B-Zellen, Monocyten und Granulozyten als Kontaminationsmarker)
- Exp. 2: Bestimmung von Vitalität und Apoptose
- Exp. 3: *Bestimmung der Funktion; intrazelluläre Zytokin-Färbung nach Stimulation (dieses Experiment konnte noch nicht abschließend getestet und die Methode noch nicht etabliert werden)*

Die Testung/Etablierung umfasst jeweils die experimentelle Neueinrichtung am FACS-Gerät sowie die Optimierung der Test-Bedingungen/Geräte-Parameter und die Festlegung des Protokolls.

Nach den folgenden Protokollen ist es bereits gelungen, Zellen vorzubereiten. Sie dienen als Grundlage für die zukünftige Analyse der extraanalytischen Faktoren auf die Zellzusammensetzung und die Vitalität der PMBC.

Assay 1: Zell-Zusammensetzung

Herstellung der Lösungen

Master-Mix Lebend-/Tot-Farbstoff:

- je Probe: 400 µL 1X DPBS + 0.5 µL FVS575V Stammlösung

Fc Block-Lösung:

- je Probe: 100 µL Stain Buffer + 5 µL Fc Block

Master-Mix extrazelluläre (Oberflächen-) Marker:

- je Probe: 200 µL Stain Buffer + folgende Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Benutzte Verdünnung	Volumen
CD45	V500-C	1:100	3 µL
CD4	PE-Cy7	1:100	3 µL
CD8	APC-H7	1:100	3 µL
CD19	APC	1:100	3 µL
CD14	PE-Cy7	1:100	3 µL
CD15	V450	1:100	3 µL
CD3	PerCP	1:25	12 µL
CD56	PE	1:25	12 µL
CD16	PE	1:25	12 µL

Zellen vorbereiten

- Zellen auftauen und in 1x DPBS (sodium azide- and protein-free) waschen
- Zellen in 1x DPBS resuspendieren und Konz. auf ca. 10 Mio./mL einstellen

Durchflusszytometrie

- Master-Mix Lebend-/Tot-Farbstoff vorbereiten
- 1 Mio. Zellen (100 µL) in FACS-Röhrchen überführen
- 400 µL Master-Mix Lebend-Tot-Farbstoff zugeben
- Für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (im Schubkasten) inkubieren
- Master-Mix Lebend-/Tot-Farbstoff vorbereiten
- Mit 1 ml Stain Buffer waschen → zentrifugieren bei 500g, 4°C, 5 min (Programm 1) → Überstand wegschütten
- Pellet in 100 µL Fc Block-Lösung resuspendieren
- Für 10 min bei Raumtemperatur (ggf. im Schubkasten) inkubieren
- 200 µL Master-Mix extrazelluläre Marker zugeben
- Für 20 min bei 4°C im Dunkeln (im Kühlschrank) inkubieren
- Mit 1 ml Stain Buffer waschen → zentrifugieren bei 500g, 4°C, 5 min (Programm 1) → Überstand wegschütten
- Pellet in 300 µL Stain Buffer resuspendieren
- MESSEN am FACS Lyric

Assay 2: Apoptose/Vitalität

Herstellung der Lösungen

Master-Mix Lebend-/Tot-Farbstoff:

- je Probe: 400 µL 1X DPBS + 0.5 µL of BD FVS575V Stammlösung

Fc Block-Lösung:

- je Probe: 100 µL Stain Buffer + 5 µL Fc Block

Master-Mix extrazelluläre (Oberflächen-) Marker:

- je Probe: 200 µL Stain Buffer + folgende Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Benutzte Verdünnung	Volumen
CD45	V500-C	1:100	3 µL

1x Wash Buffer:

- 10x Wash Buffer verdünnen (1:10) mit ddH₂O

Master-Mix intrazelluläre Marker:

- je Probe: 300 µL 1x Wash Buffer + folgende Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Benutzte Verdünnung	Volumen
Caspase-3	FITC	1:15	20 µL

Zellen vorbereiten

- Zellen auftauen und in 1x DPBS (sodium azide- and protein-free) waschen
- Zellen in 1x DPBS resuspendieren und Konz. auf ca. 10 Mio./mL einstellen

Durchflusszytometrie

- 1 Mio. Zellen (100 µL) in FACS-Röhrchen überführen
- 400 µL Master-Mix Lebend-Tot-Farbstoff zugeben
- Für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (im Schubkasten) inkubieren
- Mit 1 ml Stain Buffer waschen → zentrifugieren bei 500g, 4°C, 5 min (Programm 1) → Überstand wegschütten

- Pellet in 100 µL Fc Block-Lösung resuspendieren
- Für 10 min bei Raumtemperatur (ggf. im Schubkasten) inkubieren
- 200 µL Master-Mix extrazelluläre Marker zugeben
- Für 20 min bei 4°C im Dunkeln (im Kühlschrank) inkubieren
- Mit 1 ml Stain Buffer waschen → zentrifugieren bei 500g, 4°C, 5 min (Programm 1) → Überstand wegschütten
- Pellet vortexen und in 250 µL Fix/Perm resuspendieren
- Für 15 min bei 4°C im Dunkeln (im Kühlschrank) inkubieren
- Mit 1 ml 1x Wash Buffer waschen → zentrifugieren bei 500g, 4°C, 5 min (Programm 1) → Überstand wegschütten
- 300 µL Master-Mix intrazelluläre Marker zugeben
- Für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (im Schubkasten) inkubieren; alle 15 min vortexen
- Mit 1 ml 1x Wash Buffer waschen → zentrifugieren bei 500g, 4°C, 5 min (Programm 1) → Überstand wegschütten
- Pellet in 300 µL Stain Buffer resuspendieren
- MESSEN am FACS Lyric

In Vorbereitung auf die Evaluation des Einflusses von extraanalytischen Faktoren wurden bereits Spenderproben mit dem Analyseziel „time to processing“ kryokonserviert. Die „time to processing“ beschreibt dabei die Zeit, die zwischen Gewinnung der Blutprobe (in diesem Fall durch periphere Blutentnahme) bis zum Beginn der Isolation der PMBC verstreicht. Dabei wurden die Proben zu vier festen Zeitpunkten bearbeitet: (I) unmittelbar nach Blutentnahme (t=0); (II) vier Stunden nach Blutentnahme (t=4); (III) acht Stunden nach Blutentnahme (t=8); (IV) 24 Stunden nach Blutentnahme (t=24). Die anschließende Analyse dieser Proben steht noch aus und soll nach Abschluss der Protokolletablierung für die PBMC Funktionsanalyse erfolgen.

Ausblick

Durch eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung des Projekts ist es möglich, die noch ausstehenden, eingangs beschriebenen Ziele weiter zu verfolgen. Die Ziele sollten im Verlauf des nächsten Jahres erreicht werden. In nächster Zeit ist geplant, die Methode für die Bestimmung der PMBC Funktionalität nach Kryokonservierung vollständig zu etablieren und ein entsprechendes Protokoll festzulegen. Abschließend sollen nach Überwindung dieser größten Hürde, der Methodenetablierung, unter Anwendung der etablierten Protokolle weitere extraanalytische Faktoren bezüglich ihres Einflusses auf die Zellqualität analysiert werden. Diese Analysen sollen zur Festlegung von Qualitätskriterien führen. Die Kriterien dienen längerfristig als Grundlage für die Weiterentwicklung des von der Arbeitsgruppe der *Dresden Integrated Liquid Biobank (DILB)* am *Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (IKL)* des *Universitätsklinikums Dresden (UKD)* im Jahre 2020 in Kooperation mit *German Biobank Node (GBN)* durchgeführten Pilot-Ringversuchs zur Realisierung eines erweiterten Vergleichsprogramms des PBMC-Biobankings.

Danksagung

Abschließend möchte ich meinen Dank für die Förderung meines Promotionsprojektes gegenüber dem Vorstand und allen beteiligten Stellen der Roland-Ernst-Stiftung zum Ausdruck bringen. Das Promotionsstipendium hat es mir ermöglicht, mich, parallel zu meinem Studium, diesem Projekt zu widmen und mich in die Institutsmethoden und Labore einzuarbeiten. Außerdem war es mir möglich, bereits Zeit in die Arbeit an meiner Disserationsschrift zu investieren und projektbezogene Literatur zu recherchieren. Für die Gewährung dieser Chancen und Möglichkeiten möchte ich mich herzlichst bedanken!

Valentin Franz

27.09.2024



Literaturverzeichnis

1. Nixon AB, Schalper KA, Jacobs I, Potluri S, Wang I-M, Fleener C. Peripheral immune-based biomarkers in cancer immunotherapy: can we realize their predictive potential? *J Immunother Cancer*. 2019 Dec;7(1):325.
2. Sen P, Kempainen E, Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Mol Biosci* [Internet]. *Frontiers*; 2018 [cited 2021 Jun 29];4. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2017.00096/full>
3. Zhu L, Yang P, Zhao Y, Zhuang Z, Wang Z, Song R, Zhang J, Liu C, Gao Q, Xu Q, Wei X, Sun H-X, Ye B, Wu Y, Zhang N, Lei G, Yu L, Yan J, Diao G, Meng F, Bai C, Mao P, Yu Y, Wang M, Yuan Y, Deng Q, Li Z, Huang Y, Hu G, Liu Y, Wang X, Xu Z, Liu P, Bi Y, Shi Y, Zhang S, Chen Z, Wang J, Xu X, Wu G, Wang F-S, Gao GF, Liu L, Liu WJ. Single-Cell Sequencing of Peripheral Mononuclear Cells Reveals Distinct Immune Response Landscapes of COVID-19 and Influenza Patients. *Immunity*. 2020 Sep 15;53(3):685-696.e3.
4. Betsou F, Gaignaux A, Ammerlaan W, Norris PJ, Stone M. Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications. *Curr Pathobiol Rep*. 2019 Jun 1;7(2):17–27.
5. Higdon LE, Lee K, Tang Q, Maltzman JS. Virtual Global Transplant Laboratory Standard Operating Procedures for Blood Collection, PBMC Isolation, and Storage. *Transpl Direct*. 2016 Sep;2(9):e101.