
Bachelorarbeit

Frau
Hannah Rackwitz

**Validierung einer
durchflusszytometrischen
Methode zum Nachweis der
XIAP-Defizienz auf T-, B- und
NK-Zellen**

Mittweida, 2023

Fakultät Angewandte Computer- und
Biowissenschaften

Bachelorarbeit

Validierung einer durchflusszytometrischen Methode zum Nachweis der XIAP-Defizienz auf T-, B- und NK-Zellen

Autor:
Frau

Hannah Rackwitz

Studiengang:
Biotechnologie, B.Sc.

Seminargruppe:
BT19wM-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. Andreas Boldt

Einreichung:
Mittweida, 21.02.2023

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2023

Bibliographische Beschreibung:

Rackwitz, Hannah: Validierung einer durchflusszytometrischen Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen. - 2023. – Verzeichnisse: S. I – XI, Inhalt: S. 1 – 41, Anhang: S. XII – XIX, Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2023

Englischer Titel

Validation of a flow cytometric method for XIAP detection on T, B and NK cells

Kurzbeschreibung:

Nach der erfolgreichen Etablierung der durchflusszytometrischen Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen sollte diese validiert werden. Zur Validierung wurde ein Inter- und ein Intraassay durchgeführt. Für die anschließende Beurteilung der Präzision der Methode wurde jeweils der Variationskoeffizient der Messwerte berechnet, dieser sollte bei $\pm 20\%$ liegen. Für die Gewinnung von Referenzwerten wurde von 21 gesunden Personen Blut abgenommen und dieses analysiert. Anschließend wurden die Messwerte mithilfe des Friedman- und des Wilcoxon-Tests statistisch ausgewertet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Bachelorarbeit unterstützt haben.

Zuerst bedanke ich mich bei Hr. Boldt aus der Klinischen Immunologie, der meine Bachelorarbeit betreut und begutachtet hat. Auch für die vielen Anregungen von ihm und weiteren Kollegen und Kolleginnen, genauso wie für die konstruktive Kritik bin ich sehr dankbar. Auch Fr. Prof. Köhl und Hr. Prof. Sack habe ich zu danken, für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für klinische Immunologie anfertigen zu dürfen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Hr. Wünschiers für die Betreuung meiner Bachelorarbeit seitens der Hochschule Mittweida. Genauso wie bei allen Dozenten und Dozentinnen, die mich während meines Studiums auf die praktische Arbeit in einem Labor vorbereitet und ihr Wissen weitergegeben haben.

Ein besonderer Dank geht ebenfalls an alle Blutspender*innen, bestehend aus Kollegen und Kolleginnen, Freunden, Bekannten und Familienmitgliedern, die mir ihr Blut freiwillig zur Verfügung gestellt haben. Ohne sie wären die ganzen Versuche und das Erstellen meiner Bachelorarbeit unmöglich gewesen.

Schlussendlich geht ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie. Für die Ermöglichung meines Studiums, ihre Unterstützung und Motivation und das immer offene Ohr für mich.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Formelverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Immunsystem.....	1
1.2 Zellen des Immunsystems.....	2
1.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems	2
1.2.2 Zellen des adaptiven Immunsystems	3
1.3 Immunreaktion.....	4
1.4 Immunschwächeerkrankungen	6
1.5 XIAP-Defizienz	7
1.5.1 X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung.....	7
1.5.2 Klinischer Phänotyp.....	9
1.5.3 Diagnose und Behandlung	10
1.6 Durchflusszytometrie.....	10
2 Zielstellung.....	14
3 Material.....	15
3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	15
3.2 Probenmaterial	15
3.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer	16
3.4 Software	16
3.5 Antikörper	17
4 Methoden	18
4.1 Durchführung der durchflusszytometrischen Methode	18
4.1.1 Isolierung der PBMC	18
4.1.2 Permeabilisierung und intrazelluläre XIAP-Färbung	18
4.1.3 Sekundärmarkierung der primären Antikörper.....	19
4.1.4 Immunphänotypisierung der Lymphozyten.....	19
4.1.5 Messung und Gating-Strategie.....	20

4.2	Validierung der Methode	21
4.2.1	Durchführung eines Interassays.....	21
4.2.2	Durchführung eines Intraassays.....	21
4.3	Erhebung gesunder Referenzintervalle und statistische Analyse	22
5	Ergebnisse.....	24
5.1	Validierung der durchflusszytometrischen Methode	24
5.1.1	Ergebnisse des Interassays.....	24
5.1.2	Ergebnisse des Intraassays.....	25
5.2	Erhebung gesunder Referenzintervalle	25
5.2.1	Statistischer Vergleich des Isotypen mit den XIAP-Werten	27
5.2.2	Statistischer Vergleich der XIAP-Werte der Zellpopulationen	28
6	Diskussion	30
6.1	Validierung der durchflusszytometrischen Methode	30
6.2	Erhebung gesunder Referenzintervalle	32
6.3	Anwendung in der Diagnostik	34
7	Ausblick	37
8	Zusammenfassung	38
9	Summary.....	40
	Literaturverzeichnis	VIII
	Anhang.....	XII
	Selbstständigkeitserklärung.....	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur des XIAP-Proteins 7

Abb. 2: Schematische Darstellung der Methode Durchflusszytometrie 11

Abb. 3: Aufgetrennte Zellpopulationen des Vollblutes anhand von FSC und SSC 12

Abb. 4: Gating-Strategie für alle Messwerte 20

Abb. 5: Grafischer Vergleich des Isotypen mit dem XIAP-Röhrchen 27

Abb. 6: Grafischer Vergleich der XIAP-Werte der B-, NK- und T-Zellen 28

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien und Geräte	15
Tab. 2: Chemikalien, Lösungen und Puffer	16
Tab. 3: Software.....	16
Tab. 4: Antikörper.....	17
Tab. 5: Zellzahl und das zugehörige Volumen an PBMC beim Interassay	21
Tab. 6: Zellzahl und das zugehörige Volumen an PBMC beim Intraassay	22
Tab. 7: Messergebnisse für den Interassay	24
Tab. 8: Messergebnisse des Intraassays.....	25
Tab. 9: Mittelwert, SEM und die Perzentile für Isotyp und XIAP.....	26

Formelverzeichnis

Formel 1: Gleichung zur Berechnung des Variationskoeffizienten..... 22
Formel 2: Gleichung zur Berechnung des SEM 23

Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
APC	antigen-presenting cell (dt.: Antigenpräsentierende Zelle)
APC-R700	Allophycocyanin rot mit Emissionsmaximum bei 706 nm
BCR	B-cell receptor (dt.: B-Zell-Rezeptor)
BIR	baculovirus IAP repeat (dt.: Baculovirus-IAP-Wiederholung)
B-Zellen	bone marrow cells (dt.: Knochenmarkszellen)
CD	cluster of differentiation (dt.: Differenzierungscluster)
DC	dendritische Zelle
DIN	Deutsches Institut für Normung
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline (dt.: Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung)
EBV	Epstein-Barr Virus
EN	Europäische Norm
FCS	fetal calf serum (dt.: fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter (dt.: Vorwärtsstreulicht)
HLH	hämophagozytische Lymphohistiozytose
IAP	inhibitor of apoptosis protein (dt.: Apoptose-Inhibitor)
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (dt.: Internationale Vereinigung für Klinische Chemie und Labormedizin)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISO	International Organization for Standardization (dt.: Internationale Organisation für Normung)
Leuko	Leukozyten
Lympho	Lymphozyten
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex (dt.: Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNS	messenger-RNS (dt.: Boten-RNS)

n	Größe der Stichprobe
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (dt.: periphere mononukleäre Blutzellen)
PE-Cy7	Phycoerythrin mit Cyanin-7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMT	photomultiplier tube (dt.: Photomultiplier)
p-Wert	probabilitas-Wert (dt.: Wahrscheinlichkeitswert)
RING	really interesting new gene 1 (dt.: sehr interessantes neues Gen 1)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH2	Src-homology 2
SH2D1A	SH2-Domäne enthaltendes Protein 1A
shRNS	Short hairpin RNS
siRNS	Small interfering RNS
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases (dt.: Zweiter, von Mitochondrien abgeleiteter Aktivator von Caspasen)
SSC	sidewards scatter (dt.: Seitenstreulicht)
SOP	Standard Operating Procedure (dt.: Standardarbeitsanweisung)
T _c	zytotoxische T-Zelle
T-Zellen	Thymus-Zellen
UBA	ubiquitin-association (dt.: Ubiquitin-Verband)
V500-c	Violett mit Emissionsmaximum bei 499 nm
VK	Variationskoeffizient
\bar{x}	Mittelwert
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein (dt.: X-gebundener Inhibitor des Apoptose-Proteins)
XLP	X-linked lymphoproliferative disease (dt.: X-gekoppelte lymphoproliferative Erkrankung)
$\frac{z}{ml}$	Zellen pro ml

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

In seinem Leben ist der Mensch vielen verschiedenen äußeren Einflüssen ausgesetzt. Dabei kommt er alltäglich mit diversen Krankheitserregern wie Viren, Bakterien oder auch Pilzen in Kontakt. Damit ein so komplexes Wesen wie der Mensch diese Pathogene überlebt, besitzt er ein körpereigenes Immunsystem. Da sich Erreger schnell im Wirt vermehren können, ist es wichtig, dass das Immunsystem die Gefahren so frühzeitig wie möglich erkennt und eine effiziente Abwehrreaktion einleitet [Martin, M. et al., 2009].

Das Immunsystem aller Wirbeltiere wird in zwei Einheiten gegliedert, das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem. Wie der Name schon erahnen lässt, ist die angeborene Immunität ab Geburt an vorhanden und bildet die erste „Verteidigungslinie“ gegen die Krankheitserreger, da es bei Infektionen sofort zur Verfügung steht. Zur Bekämpfung von Pathogenen werden beim angeborenen Immunsystem sowohl zelluläre als auch humorale Mechanismen angewandt [Resch, K. et al., 2010; Schmidt, R. F. et al., 2005]. Ist eine vollständige Bekämpfung des Keims nicht möglich, reagiert zuerst das angeborene Immunsystem, bis die adaptive Immunabwehr unterstützen kann [Martin, M. et al., 2009].

Das adaptive Immunsystem ist im Gegensatz zu dem angeborenen in der Lage sich an die ständig ändernden Pathogenen anzupassen und eine große Anzahl von Antigenstrukturen zu erkennen. Während der adaptiven Immunantwort unterscheidet man zwischen der zellulär vermittelten adaptiven Immunreaktion und der humoralen. Bei der zellulären Reaktion sprechen die Thymus-Zellen (T-Zellen) auf die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) an. Zu der humoralen Immunantwort werden Reaktionen gezählt, an denen Antikörper mitwirken. Eine klare Trennung der beiden ist allerdings nicht möglich. Beim Erstkontakt mit einem Erreger reagiert das adaptive Immunsystem zwar verzögert auf diesen, jedoch bildet sich im Laufe der erstmaligen Immunreaktion eine Art Gedächtnis und die adaptive Immunität kann bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen schneller und wirksamer auf diesen ansprechen [Martin, M. et al., 2009].

1.2 Zellen des Immunsystems

1.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören die Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Während alle Zellen von einem gemeinsamen monomyeloischen Vorläufer abstammen, bilden die NK-Zellen eine Ausnahme. Sie stammen von lymphoiden Vorgängern ab [Resch, K. et al., 2010].

Dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten werden zu den Phagozyten gezählt. Bei der Phagozytose werden die gebundenen Erreger mit Plasmamembranfortsätzen ummantelt. Durch Verschmelzung der Fortsätze bildet sich ein Vesikel und der Erreger wird darin eingeschlossen und anschließend von Mikrobiziden und Enzymen getötet. Granulozyten enthalten außerdem Granula, dies sind Vesikel mit verschiedenen Mediatoren (Wirkstoffen). Monozyten besitzen einen Syntheseapparat. Dieser ermöglicht die Erneuerung von Proteinen und das Aufnehmen von neuen Funktionen im Falle einer Abwehrreaktion. Dendritische Zellen sind auf die Antigenpräsentation spezialisiert. Deshalb findet man sie hauptsächlich in Geweben, die häufig Antigenen ausgesetzt sind, wie zum Beispiel der Haut. Für die Antigenpräsentation nehmen die DCs den Erreger auf und verdauen ihn. Anschließend werden die Peptide aus den Proteinen der Pathogene zusammen mit Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche der dendritischen Zellen präsentiert und gleichzeitig auch Zytokine freigesetzt, dies aktiviert die T-Zellen der adaptiven Immunantwort. Deshalb gelten die DCs als Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität [Resch, K. et al., 2010]. Natürliche Killerzellen besitzen zwar keine spezifischen Antigenrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, können aber trotzdem virusinfizierte Zellen und Tumorzellen erkennen und abtöten. Für diese Aufgabe verfügen sie über NK-Zell-spezifische Rezeptoren. Die Rezeptoren überprüfen das Verhalten von Körperzellen, welche glykosylierte Proteine tragen. Alle gesunden Zellen des Körpers exprimieren das MHC-Klasse-I-Molekül, welches von den Rezeptoren der NK-Zelle erkannt wird und diese stoppt, bevor der Tötungsmechanismus gestartet wird. Tritt die NK-Zelle dagegen mit einer Zelle in Kontakt, die aufgrund eines Virus kein, ein verändertes oder ein fremdes MHC-Klasse-I-Molekül exprimiert, wird diese getötet. Natürliche Killerzellen setzen

außerdem Zytokine frei, mit denen sie die angeborene Immunreaktion unterstützen, beispielsweise werden diese Zytokine der Zytokinmischung der antigenpräsentierenden Zelle zugefügt [Martin, M. et al., 2009; Przewoznik, M., 2011]. Mastzellen sind vor allem für allergische Reaktionen von großer Bedeutung, da sie viele Botenstoffe enthalten, darunter auch Histamin. Dies ist im Falle einer allergischen Reaktion für die Erweiterung der Blutgefäße und somit auch für eine erhöhte Blutzufuhr zuständig [Rink, L. et al., 2012].

1.2.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

T- und Knochenmarks -Lymphozyten (B-Zellen) stellen die Zellen des adaptiven Immunsystems dar. Beide Zellarten stammen von der lymphoiden Progenitorzelle ab. Die Vorläufer der T-Zellen wandern über das Blut in den Thymus und reifen dort zu T-Lymphozyten aus. Während ihrer Reifung erhalten sie einen funktionstüchtigen Antigenrezeptor, der nicht auf körpereigene Antigene reagieren darf. Anschließend verlassen sie den Thymus und zirkulieren im Blut bis in die sekundären lymphatischen Organe, dies sind beispielsweise Lymphknoten oder die Milz. Dort überprüfen sie die antigenpräsentierenden Zellen auf die Peptide der Antigene. Die Antigenrezeptoren der T-Lymphozyten sind nur in der Lage Peptide zu erkennen, wenn diese von APCs in den MHC-Molekülen dargeboten werden, das heißt, T-Lymphozyten haben nicht die Fähigkeit intakte Erreger zu erkennen [Martin, M. et al., 2009].

Bei den T-Lymphozyten unterscheidet man zwischen zwei Hauptpopulationen. Die Aufgabe der zytotoxischen T-Lymphozyten (Tcs) ist es, virusinfizierte und veränderte Zellen abzutöten. So verhindern sie die weitere Produktion von Viruspartikeln. Da diese Zellen auf ihrer Oberfläche das Differenzierungscluster (CD) 8-Glykoprotein als Korezeptormolekül exprimieren, werden die Tcs auch als CD8⁺ T-Zellen bezeichnet. Sie erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle, diese helfen bei der Kontrolle des intrazellulären Raumes [Martin, M. et al., 2009].

T-Lymphozyten, die die Entzündungsreaktion verstärken und B-Lymphozyten bei der Antikörperproduktion unterstützen, nennt man dagegen T-Helferzellen. Sie exprimieren das CD4-Molekül und treten mit dem MHC-Klasse-II-Molekül in Kontakt [Martin, M. et al., 2009].

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyt-Vorläufern verbleiben die Vorläufer der B-Lymphozyten im Knochenmark und reifen dort aus. Auch sie erhalten Antigenrezeptoren. Die B-Zell-Rezeptoren (BCR) stellen Antikörper dar, die in der Plasmamembran verankert sind. Sie müssen in direkten Kontakt mit dem Antigen treten, um dieses erkennen zu können. Deshalb ist es für die Rezeptoren der B-Lymphozyten unmöglich, Antigene zu erkennen, die intrazellulär vorhanden sind. Nach ihrer Reifung begeben sich die B-Zellen ebenfalls über das Blut in die sekundären lymphatischen Organe. Dort beginnen sie mit der Hilfe von T-Helferzell-Zytokinen zu proliferieren und nach einem Klassenwechsel mit der Differenzierung zu Plasmazellen. Diese sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich [Martin, M. et al., 2009].

1.3 Immunreaktion

Wenn ein Erreger in den Körper eindringt, wird dieser zuerst von dem angeborenen Immunsystem erkannt und bekämpft. Es erfolgt ein Wettkampf zwischen der Vermehrung des Erregers und der Erregerabwehr. Diese kann beispielsweise mithilfe von NK-Zellen oder durch die Phagozytose stattfinden. Die Peptide des Antigens werden zusätzlich von antigenpräsentierenden Zellen, wie der dendritischen Zelle mit ihren MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Die T-Zellen erkennen im Lymphknoten ihr präsentiertes Peptid, werden aktiviert und wandern in die Gewebe. Zusätzlich werden sie durch die Zytokine der DCs zur klonalen Expansion angeregt. Damit sich die CD8-positiven T-Zellen in einem Lymphknoten, der sich in unmittelbarer Nähe des virusinfizierten Organs befindet, weiter vermehren, wird der Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) benötigt. Eine wichtige Rolle spielt ebenfalls Interferon- γ (IFN γ), welches die Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle in den B-Lymphozyten bzw. Makrophagen steigert. Nun sind auch diese Zellen in der Lage, Antigene zu präsentieren [Martin, M. et al., 2009].

IFN γ wird von vielen Zellen gebildet und der Wachstumsfaktor IL-2 durch alle T-Zellarten. Da aber in der Anfangsphase der Erstreaktion noch keine T-Helfer-Lymphozyten vorliegen, wird das IFN γ von NK-Zellen bereitgestellt [Martin, M. et al., 2009].

Die zytotoxische T-Zelle löst in der erkannten Zelle die Apoptose aus, z.B. durch Granzyme oder Perforin. Dabei wird eine lokale akute Entzündung verhindert, da die apoptotische Zelle die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren blockiert. Gleichzeitig differenziert sich ein Teil der zytotoxischen T-Zellen in CD8-positive Gedächtniszellen [Martin, M. et al., 2009].

Auch die B-Lymphozyten erkennen das Antigen mit ihrem BCR und werden so aktiviert. Dabei werden ihre Rezeptoren auf der Oberfläche quervernetzt und mit dem gebundenen Antigen von der B-Zelle internalisiert. Die dabei entstehenden Proteinbestandteile des Antigens präsentiert der B-Lymphozyt mit seinem MHC-Klasse-II-Molekül für die T-Helferzellen. Während dieses Prozesses befindet sich die B-Zelle in direkter Nachbarschaft zu einer APC, welche ebenfalls die Peptide des Erregers präsentiert. Die T-Helferzelle stellt dem B-Lymphozyten Zytokine und kostimulatorische Moleküle bereit. Diese sorgen dafür, dass die B-Zelle proliferiert und zu einer Plasmazelle ausdifferenziert. Die Plasmazellen beginnen mit der Produktion von Immunglobulin (Ig) M-Antikörpern. Ein Teil der antigenspezifischen B-Lymphozyten zirkulieren in die Lymphknoten, proliferieren und führen einen Klassenwechsel durch. Dieser ist ursächlich für die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern wie IgG oder IgA anstelle von IgM. Danach differenzieren sie ebenfalls zu Plasmazellen. Nach ein paar Tagen oder Wochen sterben die meisten dieser Zellen ab, nur etwa 10% der Plasmazellen überleben und tragen zum immunologischen Gedächtnis bei [Martin, M. et al., 2009].

Sobald alle Erreger bekämpft sind, fehlt es sowohl für die Phagozytose als auch für die T-Effektorzellen an antigenen Stimuli. Die Makrophagen begeben sich in eine postinflammatorische Phase, in der vorwiegend antiinflammatorische Mediatoren freigesetzt werden. Diese binden und neutralisieren die proinflammatorischen Zytokine und die akute Entzündung wird gestoppt. Die Makrophagen sorgen ebenfalls für eine Reparatur des Immunsystems. Von ihnen werden gehäuft Wachstumsfaktoren sezerniert, wie beispielsweise ein Faktor für Bindegewebszellen. Dieser verschließt aufgetretene Beschädigungen im Bindegewebe [Martin, M. et al., 2009].

Der Grund für eine schnellere Reaktion seitens des Immunsystems bei einer Zweitinfektion mit demselben Erreger, liegt an der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses durch Entstehung von T- und B-Gedächtniszellen während der Erstreaktion. Deshalb sind schon von Anfang an während einer Zweitreaktion mehr antigenspezifische Lymphozyten vorhanden. Aufgrund ihrer niedrigeren Aktivierungsschwelle sind diese Zellen in der Lage schneller als die naiven Lymphozyten auf den Erreger zu reagieren und zu proliferieren [Martin, M. et al., 2009].

Fehler in der Immunantwort sind häufig Ursache für schwere Erkrankungen. Autoimmunkrankheiten entstehen, wenn das Immunsystem gegen die körpereigenen Antigene kämpft [Martin, M. et al., 2009; Resch, K. et al., 2010].

1.4 Immunschwächeerkrankungen

Diese Art von Krankheiten treten auf, wenn Defekte in den Komponenten des Immunsystems vorhanden sind. Immunschwächeerkrankungen können schwere lebensbedrohliche Erkrankungen wie Autoimmunitäten, Lymphome und andere Krebsarten oder auch Infektionen als Folge haben. Oft werden Patienten mit einer Immunschwäche an ihrer klinischen Geschichte erkannt, da diese von wiederholten Infektionen mit ähnlichen Erregern zeugt. So weisen zum Beispiel zahlreiche Virusinfektionen auf einen Immundefekt mit Beteiligung der T-Lymphozyten hin [Murphy, K. M. et al., 2018].

Dabei wird zwischen primären und sekundären Immunschwächen unterschieden. Sekundäre Immunschwächeerkrankungen kommen häufiger vor und können erworben werden. Ursachen sind beispielsweise Unterernährung, Komplikationen bei medizinischen Behandlungen oder längere schwere Krankheiten. Primäre entstehen durch vererbte Mutationen und sind genetisch bestimmt. Dabei kommen sie als einzelne Krankheit oder als Teil eines Syndroms vor. Die Symptome treten häufig schon im Kindesalter auf und durch den X-chromosomalen Erbgang stellen 60% der Fälle männliche Patienten dar. Dies liegt daran, dass Männer nur ein X-Chromosom besitzen und beim Erben einer X-gekoppelten Erkrankung diese auch ausbilden. Da Frauen ein zweites, unverändertes X-Chromosom besitzen, bleiben sie normalerweise gesund. Zu den primären Immunschwächeerkrankungen gehören humorale, zelluläre, eine Kombination aus beiden und Phagozytendefekte. Humorale Immunschwächestörungen

werden auch B-Zell-Defekte genannt und verursachen einen Antikörpermangel. Patienten mit dieser Defizienz sind anfälliger für bakterielle Infektionen. Spezifisch für den Phagozytendefekt sind Hautinfektionen durch Staphylokokken und andere gramnegative Erreger. T-Zell-Störung oder auch zelluläre Immunschwächeerkrankung erhöhen dagegen die Anfälligkeit gegenüber Pilzen und Viren. Zu dieser Art von Krankheit zählt auch das X-gekoppelte lymphoproliferative Syndrom, welches durch eine „X-linked inhibitor of apoptosis protein“ (X-gebundener Inhibitor eines Apoptose-Proteins; XIAP)-Defizienz hervorgerufen wird. [Murphy, K. M. et al., 2018; Lentze, M. J. et al., 2003].

1.5 XIAP-Defizienz

1.5.1 X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung

Bei der X-chromosomalen lymphoproliferativen Erkrankungen handelt es sich um eine primäre lebensbedrohliche Immundefizienz. Verursacht wird diese durch Mutationen im *XIAP*- oder im „*Src-homology 2 domain –containing protein 1A*“ (*SH2D1A*)-Gen. Wenn die Mutationen das *SH2D1A*-Gen betreffen, spricht man von einer X-gekoppelten lymphoproliferativen Erkrankung (XLP) 1 und wenn Mutationen im *XIAP*-Gen vorliegen, von XLP2 bzw. einer XIAP-Defizienz, auch Duncan- oder Purtilo-Syndrom genannt. Da diese Immundefizienz von Purtilo bei der Familie Duncan das erste Mal beschrieben wurde [Mudde, A. C. A. et al., 2021; Pachlopnik Schmid, J. et al., 2011].

Das *XIAP*-Gen codiert das XIAP-Protein, welches in allen Zellen des hämatopoetischen Systems vorhanden ist. Dabei handelt es sich um ein 56 Kilodalton schweres und 497 Aminosäuren langes Protein, welches den Apoptose-Inhibitoren (IAPs) zugeordnet wird [Mudde, A. C. A. et al., 2021; Horn, P. C., 2014].



Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur des XIAP-Proteins. Dargestellt vom N- zum C-Terminus, bestehend aus drei BIR-Regionen (blau), einer UBA (orange) und einer RING-Domäne (grün).

Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, besteht das Protein aus drei Baculovirus-IAP-Wiederholungen (BIRs), einer „Really interesting new gene 1“ (RING)-Domäne und einer Ubiquitin-Verband (UBA)-Domäne [Latour, S. et al., 2015]. Mithilfe seiner UBA-Domäne bindet XIAP Polyubiquitinketten und ist so ebenfalls Bestandteil des Ubiquitin-abhängigen Signalwegs. Die RING-Domäne besitzt Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Diese erlaubt XIAP andere Proteine für den proteasomalen Abbau anzusteuern bzw. deren Aktivität zu verändern [Mudde, A. C. A. et al., 2021; Al-Rubeai, M., 2004].

Die Aufgabe der drei BIRs umfasst die Kontaktaufnahme mit Caspase-3, -7 und -9. Dies sind Proteasen, welche für die Zerlegung von Zellen zuständig sind. Durch die Kontaktaufnahme der BIRs mit den Caspasen wird dem XIAP-Protein seine anti-apoptotische Funktion verliehen, denn für die Apoptose gibt es drei unterschiedliche Arten der Aktivierung, die die Aktivierung von Caspase-3 gemeinsam haben. Diese kann von den IAPs gehemmt und der Zelltod reguliert werden. XIAP ist dabei der stärkste Vertreter dieser Proteine [Horn, P. C., 2014; Hallenberger, L., 2021]. Laut Thakker ist XIAP ebenfalls in CD8-positiven T-Zellen für die Regulation der CD8+ T-Zellantwort verantwortlich. Zum einen wird durch XIAP die Proliferation und das Überleben von den aktivierten T-Zellen gewährleistet, indem es die Apoptose der APCs hemmt. Zum anderen inhibiert es außerdem noch die Apoptose fördernden Signale in den aktivierten T-Zellen und sorgt für eine Verlängerung der Immunantwort [Thakker, P., 2021].

Bis heute sind etwa 90 krankheitsverursachende Mutationen im *XIAP*-Gen bekannt, die zu einer XLP2 führen. Diese tritt bei ca. 1-2 Menschen pro Millionen männlicher Geburten auf. Diese Mutationen sind unter anderem Missense-Mutationen, Nonsense-Mutationen, Insertionen oder Deletionen. Für einen Mangel des XIAP-Proteins sind Nonsense-Mutationen und Deletionen verantwortlich, während Missense-Mutationen die Ursache für ein dysfunktionales Protein sind [Mudde, A. C. A. et al., 2021]. Wichtig ist jedoch, dass das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein von XIAP nichts daran ändert, ob die Apoptose stattfindet. Es ist eher so, dass beim nicht Vorhandensein von XIAP ein selbstverstärkender Apoptose-Kreislauf startet. Sobald die Caspasenkette anläuft, wird Cytochrom C freigesetzt, getriggert durch Caspase-3. Durch das Cytochrom C wird ein Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-Faktor 1 aktiviert, welcher sich mit Adenosintriphosphat zu einem Apoptosom verbindet. Durch das entstandene Apoptosom

wird Caspase-9 dauerhaft aktiviert und der Zyklus wiederholt sich [Mudde, A. C. A. et al., 2021; Al-Rubeai, M., 2004; Horn, P. C., 2014]. Infolge der anormalen Aktivierung der Caspasen reagieren die Zellen des Immunsystems sensibler auf pro-apoptische Stimuli und eine defekte Immunantwort folgt. Dies wird von einem komplexen Phänotyp begleitet [Murphy, K. M. et al., 2018].

1.5.2 Klinischer Phänotyp

Der Phänotyp von Patienten mit einer XIAP-Defizienz kann variieren, aufgrund der unterschiedlichen Symptome, welche unabhängig voneinander vorkommen können. Auch der Zeitpunkt des Auftretens der Krankheit ist variabel, manche Patienten sind bis ins Erwachsenenalter symptomfrei, während bei anderen bereits ab dem Neugeborenenalter Symptome, wie Kolitis oder wiederkehrende Fieberschübe, auftreten können [Mudde, A. C. A. et al., 2021; Girardelli, M. et al., 2015].

XLP2 ist durch eine höhere Anfälligkeit gegenüber dem Epstein-Barr-Virus (EBV) charakterisiert. Dieser Virus befällt die B-Zellen und wird bei Patienten nicht vollständig bekämpft, sondern bleibt latent erhalten und führt zu einer übermäßigen EBV-Infektion. Folgeerscheinungen sind eine übersteigerte Expansion von EBV-infizierten B-Zellen, der zytotoxischen T-Zellen und eine Hypogammaglobulinämie [Pachlopnik Schmid, J. et al., 2011; Murphy, K. M. et al., 2018]. Bei Letzteren kann der Körper keine oder nur zu wenig Immunglobuline herstellen [Jäger, L., 1978]. Außerdem entwickelt sich eine Infektion mit EBV oft zu einer wiederkehrenden hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH), welche durch eine erhöhte T-Lymphozyt- und Makrophagen-Aktivierung verursacht wird [Pachlopnik Schmid, J. et al., 2011]. Diese akkumulieren in den Organen und setzen dort eine Vielzahl an pro-inflammatorischen Zytokinen frei. Folgen dieser Akkumulation sind Gewebsschäden und Organversagen, und machen HLH zu einem lebensbedrohlichen Symptom [Mudde, A. C. A. et al., 2021]. Patienten mit diesem Symptom weisen eine übersteigerte Expansion von aktivierten Makrophagen, EBV-infizierten B-Zellen und aktivierten T-Zellen auf. Dies führt zu einer unkontrollierten Immunantwort [Latour, S., 2007]. Aber auch ohne vorherige EBV-Infektion entwickeln die meisten Patienten eine HLH [Filipovich, A. H. et al., 2010].

Aufgrund der Überproduktion von pro-entzündlichen Zytokinen können außer HLH auch noch andere entzündliche Phänomene entstehen. Die am häufigsten vorkommenden

Symptome sind neben HLH, eine Splenomegalie und entzündliche Darmerkrankungen. Seltener Symptome bei einer XIAP-Defizienz sind Hautabszesse, Uveitis, Fieber und Giardia enteritis [Müller, N. C., 2018].

Die entzündlichen Darmerkrankungen weisen Ähnlichkeiten zu Morbus Crohn auf. Symptome dafür können Bauchschmerzen, Gewichtsverlust, Durchfall, usw. sein und sind häufig schon ab der Geburt vorhanden. Forscher fanden heraus, dass die chronischen Entzündungen im Darm Folgen einer Immunreaktion gegen das Mikrobiom sind und dabei sogar die Zusammensetzung der Darmflora verändert wird, indem auch gutartige Bakterien abgetötet werden [Müller, N. C., 2018; Mengy, S. S., 2021; Kostic, A. D. et al., 2014].

1.5.3 Diagnose und Behandlung

Standardmäßig wird die XIAP-Defizienz durch die Identifikation der Mutationen im beteiligten Gen diagnostiziert. Dies erfolgt über das genetische Sequenzieren. Da bei vielen XIAP-Patienten die XIAP-Expression fehlt oder minimiert ist, bietet die Durchflusszytometrie eine effiziente Screening-Technik, auch wenn es für diese Immundefizienz noch keinen Screening-Test gibt [Mudde, A. C. A. et al., 2021; Marsh, R. A. et al., 2009].

Da bis heute die genaue Krankheitspathologie der XLP2 noch nicht ganz verstanden ist, sind nur begrenzt Behandlungsmöglichkeiten vorhanden, was auch die hohe Sterblichkeitsrate dieser Erkrankung erklärt [Müller, N. C., 2018]. Die bisher alleinige heilende Behandlung erfolgt über die hämatopoetische Stammzelltransplantation, am besten vor dem 15. Lebensjahr. Allerdings ist diese riskant und birgt ein hohes Sterberisiko [Latour, S. et al., 2015].

1.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine analytische Methode, bei der Zellen anhand ihrer physikalischen Eigenschaften gemessen werden. Diese können beispielsweise Granularität oder auch Größe sein [Adan, A. et al., 2017]. So ist es möglich, die unterschiedlichen Zelltypen innerhalb einer heterogenen Zellpopulation zu identifizieren. Dies geschieht anhand der an die Zellen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe

[Macey, M. G., 2007]. Die Methode findet in vielen biologischen Bereichen Anwendung, beispielsweise in der Molekularbiologie, Virologie oder der Immunologie [McKinnon, K. M., 2018].

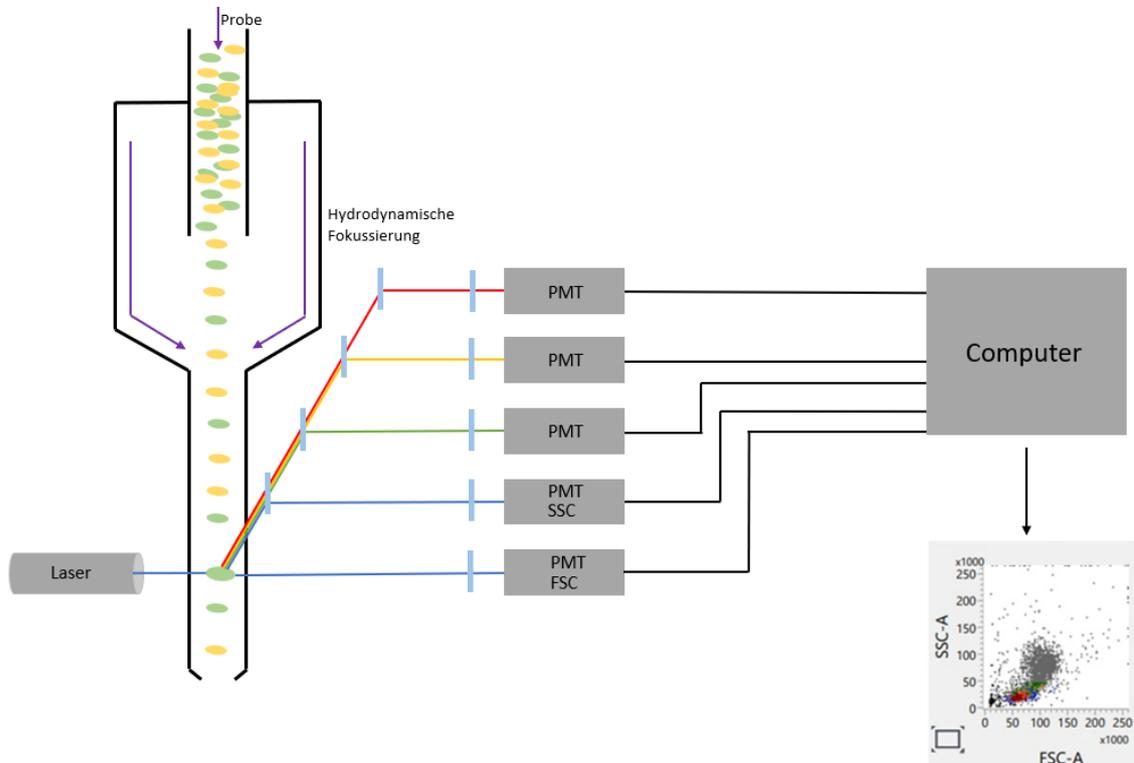


Abb. 2: Schematische Darstellung der Methode Durchflusszytometrie. Die Zellen (grün und gelb) werden in einen Einzelzellstrom geformt und die konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe von dem Laser angeregt. Das gestreute Licht wird von den Photomultiplier (PMT) gemessen.

Das Gerät, welches die Zellen misst, wird Durchflusszytometer genannt. Der grobe Ablauf der Methode wird in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Zuerst wandern die fluoreszenzmarkierten Zellen in Suspension in die Durchflusskammer des Durchflusszytometers. Diese hat die Aufgabe die Zellen mithilfe der hydrodynamischen Fokussierung in einen Einzelzellstrom zu formen und ihn zu den Lasern zu leiten. Die Umformung der Zellen in einen Einzelzellstrom ist wichtig, um die maximale Auflösung der Messung erreichen zu können. Die Zellen passieren anschließend einzeln den Laserstrahl und dabei werden die konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe mit spezifischen Wellenlängen angeregt. Das gestreute und emittierte Licht wird von Filtern und Spiegeln zu den Photodetektoren, den sogenannten Photomultiplier (PMT) geleitet. Diese messen das Licht und anhand der verschiedenen Farbstoffe kann das gemessene Signal der

jeweiligen Zellgruppe zugeordnet werden. Der Forward Scatter (FSC) sammelt das Licht, welches vorwärts gestreut wird und somit die Größe der jeweiligen Zelle misst. Der Side Scatter (SSC) misst dagegen rechtwinklig zum Laser gestreutes Licht. Dies gibt Hinweis über Granularität der Zelle. So lassen sich zum Beispiel bei der Messung von Vollblut die einzelnen Zellpopulationen anhand ihrer Größe bzw. Granularität aufzeigen, wie es in Abbildung 3 dargestellt wird [Murphy, K. M. et al., 2018; Goetz, C. et al., 2018; Macey, M. G., 2007].

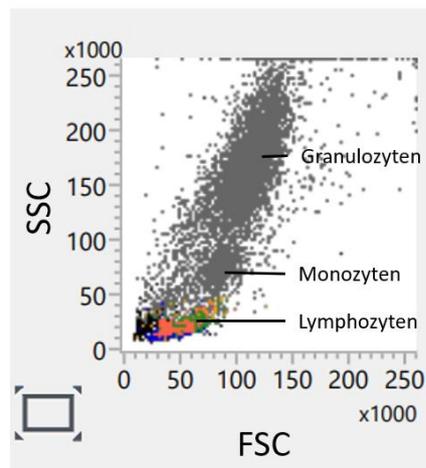


Abb. 3: Aufgetrennte Zellpopulationen des Vollblutes anhand von FSC und SSC. Mit steigender Granularität und Größe. Erstellt wurde das Punktwolkendiagramm in der Software BD FACSSuite.

Bei der Auftrennung der Zellpopulationen im Blut in Abbildung 3 sind vier Zellwolken sichtbar. Die linke untere schwarze Zellwolke zeigt die bereits abgestorbenen Zellen und Zelldebris. Darüber folgen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten mit aufsteigender Größe und Granularität [Luttmann, W. et al., 2014].

Die gemessenen Emissionen werden daraufhin von dem elektrischen System in digitale Signale umgewandelt. Diese lassen sich anschließend an einem Computer mit spezieller Software analysieren. Dabei können die Daten beispielsweise in Dotplots, also Punktwolkendiagrammen oder Histogrammen veranschaulicht werden [Goetz, C. et al., 2018].

Zum Analysieren der Daten wird das sogenannte Gating verwendet. Dies beschreibt das Auswählen bestimmter, für den Experimentator interessante Bereiche innerhalb der Plots, die das Analysieren der Messdaten erleichtern. Dabei kann man verschiedene Formen als

Gates verwenden, wie z.B. Quadrate. Welche Form gewählt wird, ist abhängig von der zu untersuchenden Zellpopulation [Goetz, C. et al., 2018].

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die im Praxismodul etablierte durchflusszytometrische Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen zu validieren.

Zur Validierung gehört einerseits die statistische Auswertung. Für diese sollen 21 gesunde Referenzwerte erschaffen werden. Anschließend sollen von den gesunden Messwerten der Mittelwert, der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und das 2,5%- und 97,5%-Perzentil berechnet werden. Die Perzentile schließen einen Referenzintervall ein, der als Normwert für zukünftige Messungen dienen soll. Bei allen Messungen soll eine Isotypkontrolle mitlaufen.

Andererseits soll für die Überprüfung der Präzision der durchflusszytometrischen Methode ein Inter- und ein Intraassay erstellt werden. Für den Interassay wird dabei einer Person an fünf unterschiedlichen Tagen Blut abgenommen und dieses analysiert, während für den Intraassay einer Person an einem Tag fünf Blutproben abgenommen werden, um dieses zu analysieren. Als Beurteilung der Präzision soll der Variationskoeffizient (VK) beider Assays berechnet werden. Dieser soll $\pm 20\%$ betragen.

Zum Schluss soll nach erfolgreicher Validierung für das immunologische Labor eine Standardarbeitsanweisung (SOP) geschrieben werden. Anhand dieser sollen zukünftige Messungen in der klinischen Routinediagnostik durchgeführt werden.

3 Material

3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Kühlschrank	Liebherr/Bulle, Schweiz
Gefrierschrank	Liebherr/Bulle, Schweiz
Klasse II-Sicherheitswerkbank	Clean Air by Baker/Utrecht, Niederlande
Hämatologie-Analysesystem XP 300	Sysmex/Kōbe, Japan
Durchflusszytometer BD FACSLyric	BD Biosciences/ New Jersey, USA
Vortex-Mischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries/New York, USA
Zentrifuge Rotina 46 RS	Hettich Zentrifugen/Tuttlingen, Deutschland
FACS-Röhrchen mit Rundboden (5 ml)	Falcon® A Corning Brand/New York, USA
Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG/Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette mit Heparin (4,7 ml)	Sarstedt AG & Co. KG/Nümbrecht, Deutschland

3.2 Probenmaterial

Für den Intra- und Interassay werden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut benötigt. Dazu wurden den Spender*innen je 4,7 ml antikoagulatorisches Heparin-Blut abgenommen.

Auch für die Erschaffung von den Referenzintervallen wurden von den Spender*innen 4,7 ml antikoagulatorisches Heparin-Blut abgenommen. Blut gespendet hatten insgesamt 21 gesunde Personen im Alter von 20 bis 63 Jahren. Dabei waren 5 der Probanden männlich und 16 weiblich. Keiner nahm zur Zeit der Blutabnahme immunologisch auffällige Medikamente ein.

3.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tab. 2: Chemikalien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Hersteller	LOT-Nr.	Lagerung
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS); steril	PAN Biotech/Aidenbach, Deutschland	6890622	Raumtemperatur
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO/Massachusetts, USA	2243864	2-8°C
Human Pancoll- Lösung; steril; Dichte: 1,077 g/ml	PAN Biotech/Aidenbach, Deutschland	4370921	Raumtemperatur, dunkel
4x Fix/Perm-Puffer	BD Pharmingen/New Jersey, USA	2129911	2-8 °C
Verdünnungspuffer	BD Pharmingen/New Jersey, USA	2129911	2-8 °C
5x Perm/Wash- Puffer	BD Pharmingen/New Jersey, USA	2129911	2-8 °C

3.4 Software

Tab. 3: Software

Software	Entwickler
BD FACSSuite	BD Biosciences/New Jersey, USA
SigmaPlot 14.0 (2017)	SYSTAT/Kalifornien, USA
Microsoft Excel (2019)	Microsoft Corporation/ Washington, USA

3.5 Antikörper

Tab. 4: Antikörper

Antikörper mit konjugiertem Farbstoff	Klon	Hersteller	LOT-Nr.	Lagerung
Mouse Anti-Human CD3-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	SK7	BD Biosciences/New Jersey, USA	2055075	2-8 °C
Mouse Anti-Human CD16-Phycoerythrin mit Cyanin-7 (PE-Cy7)	B73.1	BD Biosciences/New Jersey, USA	2035486	2-8 °C
Mouse Anti-Human CD56-PE-Cy7	NCAM16.2	BD Biosciences/New Jersey, USA	2171595	2-8 °C
Mouse Anti-Human CD19-Allophycocyanin rot mit Emissionsmaximum bei 706 nm (APC-R700)	HIB19	BD Horizon/New Jersey, USA	1308671	2-8 °C
Mouse Anti-Human CD45-Violett mit Emissionsmaximum bei 499 nm (V500-c)	2D1	BD Biosciences/New Jersey, USA	2040526	2-8 °C
Mouse Anti-XIAP	48/hILP/XIAP	BD Transduction Laboratories/New Jersey, USA	2080769	-20 °C
Mouse IgG Isotyp	MOPC-21	BD Pharmingen/New Jersey, USA	1104456	2-8 °C
Goat Anti-Mouse IgG-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	unbekannt	SouthernBiotech/Alabama, USA	I0420NJ 11F	2-8 °C

4 Methoden

4.1 Durchführung der durchflusszytometrischen Methode

Die Methode wurde analog zum etablierten Protokoll „Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen“ [Rackwitz, H., 2022] durchgeführt und gemessen. Die genaue Durchführung ist ebenfalls in der SOP „SOP 4-482 - Nachweis XIAP“ im Anhang zu sehen.

4.1.1 Isolierung der PBMC

Für die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der PBMC wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Zuerst wurden 4,7 ml Blut 1:1 mit DPBS verdünnt. Und in ein neues beschriftetes 15 ml Röhrchen 3 ml Pancoll vorgelegt. Anschließend wurde die Blutverdünnung langsam über das Pancoll geschichtet. Die Probe wurde bei Raumtemperatur (RT) bei 1000 g für 25 min mit Bremse und Anlauf bei 1 zentrifugiert. Währenddessen wurde in einem neuen beschrifteten Röhrchen 6 ml DPBS vorgelegt. Der entstandene Lymphozytenring wurde nach der Zentrifugation mit einer Pasteur-Pipette langsam und kreisförmig abgesaugt und in das vorbereitete Röhrchen mit dem DPBS überführt. Das Röhrchen wurde invertiert und dann wieder bei RT, 500 g für 10 min zentrifugiert. Bremse und Anlauf wurden auf 9 gestellt. Während der Zentrifugation wurde der DPBS/5% FCS-Puffer aus 2,5 ml FCS und 47,5 ml DPBS hergestellt und danach der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Daraufhin wurden 9 ml DPBS und 1 ml DPBS/5% FCS zum Pellet gegeben und erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und 2 ml DPBS/5% FCS zum Pellet pipettiert und dieses resuspendiert.

4.1.2 Permeabilisierung und intrazelluläre XIAP-Färbung

Damit die intrazellulären Farbstoffe in die Zellen gelangen können, musste vorher eine Permeabilisierung erfolgen. Bei dieser wurden die Zellmembranen der Zellen zerstört. Vor der Permeabilisierung wurde von den isolierten PBMC die Zellzahl gemessen und in ein beschriftetes Isotyp- bzw. XIAP-Röhrchen so viel PBMC pipettiert, um 1×10^6 Zellen pro ml ($\frac{Z}{ml}$) zu erhalten.

Zum Permeabilisieren der Zellen wurde ein 1x Fix/Perm-Puffer benötigt. Dieser wird aus 1 ml 4x Fix/Perm und 3 ml Verdünnungspuffer hergestellt. In jedes der Röhren wurde davon 1 ml gegeben, gevortext und die Proben für 40 min im Kühlschrank inkubiert. Und aus 14 ml 5x Perm/Wash und 56 ml destilliertem Wasser der 1x Perm/Wash vorbereitet. Anschließend wurden sie zweimal mit 1 bzw. 2 ml 1x Perm/Wash gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur für 6 min mit 350 g. Bremse und Anlauf wurden auf 9 eingestellt. Alle folgenden Waschschrte wurden bei diesen Einstellungen durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets auf einem Vortexer aufgelockert. Inzwischen wurde der primäre XIAP-Antikörper für die intrazelluläre Färbung aus der Kühlung geholt.

Zu Beginn der intrazellulären Färbung wurden die Pellets in 100 μ l 1x Perm/Wash aufgenommen. Anschließend wurde in die beiden XIAP-Röhren 2,5 μ l XIAP-Antikörper und in die Isotyp-Röhren 0,5 μ l des primären Isotyp-Antikörpers pipettiert. Nach erneutem vortexen wurden die Proben wieder für 40 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit je 2 ml des 1x Perm/Wash. Der Waschpuffer wurde wieder abgekippt und die Pellets zwischendurch gevortext.

4.1.3 Sekundärmarkierung der primären Antikörper

Der nächste Schritt war die Sekundärmarkierung. Dafür wurden die Pellets in je 100 μ l 1x Perm/Wash aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 2,5 μ l FITC-Antikörper dazugegeben und die Proben gevortext. Dann erfolgte eine 30-minütige Inkubation im Kühlschrank mit anschließendem zweimaligem Waschen mit je 3 ml 1x Perm/Wash-Puffer. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets zwischen den Waschschrten gevortext.

4.1.4 Immunphänotypisierung der Lymphozyten

Als letztes erfolgte die Immunphänotypisierung der Lymphozyten. In jedes der Röhren wurden je 5 μ l der Anti-CD3-PerCP, Anti-CD16/56-PE-Cy-Antikörper und jeweils 2,5 μ l des Anti-CD19-APC-R700 und Anti-CD45-V500-c pipettiert und mit den PBMC vorsichtig auf einem Vortexer vermischt. Die Proben wurden eine Viertelstunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml

DPBS/5% FCS gewaschen und zum Messen in jeweils 500 µl DPBS/5% FCS aufgenommen und gevortext.

4.1.5 Messung und Gating-Strategie

Das Analyseprotokoll und die Einstellungen für das Instrumentensetting, also die Kompensation und die Voltzahlen der durchflusszytometrischen Messungen wurden aus dem bereits etablierten Protokoll übernommen. Ebenso wie die angewandte Gating-Strategie für das Isotyp- und das XIAP-Röhrchen (siehe Abb. 5). Die genauen Einstellungen sind ebenfalls in der SOP im Anhang festgehalten.

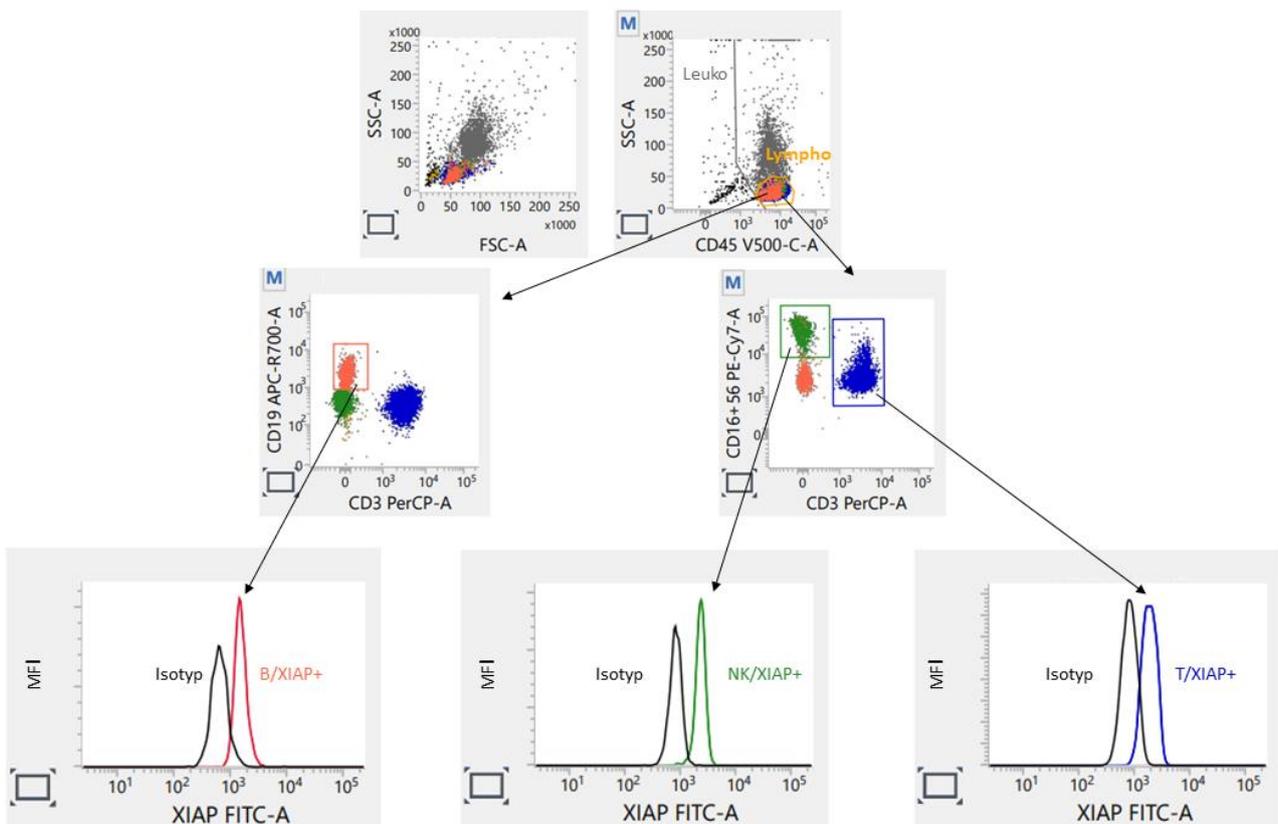


Abb. 4: Gating-Strategie für alle Messwerte. In den Dotplots sind die jeweiligen Lymphozyten-Unterpopulationen in ihren jeweiligen Farben (T – blau, B – rot, NK – grün) dargestellt. Und in den Histogrammen die jeweilige XIAP+ Zellpopulation (bunt) im Vergleich zum Isotypen (schwarz). Dabei müssen die XIAP+ Zellen eine mindestens doppelt so hohe Fluoreszenzintensität aufweisen als die Isotypen.

Im Dotplot CD45 gegen SSC wurde jeweils ein Gate um die Leuko- und Lymphozyten gezogen. Letzteres bildet die Grundlage, um in den CD3 gegen CD19 bzw. CD16/56 die

T-, B- und NK-Zellen mit ihren Gates darstellen zu können. Ausgehend von diesen Gates wurden anschließend die XIAP-positiven Zellpopulationen in den Histogrammen im Vergleich zum Isotyp in ihrer jeweiligen Gate-Farbe dargestellt, wobei die XIAP-positiven Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität aufweisen als der zugehörige Isotyp.

Die Messungen der Proben erfolgten am Versuchstag. Dabei wurde das Stopping-Gate auf 10.000 Lymphozyten eingestellt. Dies diente zur Limitierung der durchflusszytometrischen Messung. Wurden während einer Messung keine 10.000 Lymphozyten innerhalb von 2 min erreicht, endete die Messung nach dieser Zeit.

4.2 Validierung der Methode

4.2.1 Durchführung eines Interassays

Zur Durchführung des Interassays wurde derselben gesunden Person an fünf unterschiedlichen Tagen 4,7 ml antikoagulatorisches Heparin-Blut abgenommen. Alle fünf Blutproben wurden an den jeweiligen Tagen wie im Abschnitt 4.1 auf XIAP analysiert. Dabei sollen am Ende reproduzierbare Resultate vorliegen.

Die jeweilige eingesetzte Menge an PBMC für $1 \times 10^6 \frac{Z}{ml}$ ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Zellzahl und das zugehörige Volumen an PBMC beim Interassay

Probe	Gemessene Zellzahl [$\frac{Z}{ml}$]	Eingesetztes Volumen PBMC pro Röhrchen für $1 \times 10^6 \frac{Z}{ml}$
1	$2,1 \times 10^6$	476 μ l
2	$2,1 \times 10^6$	476 μ l
3	$2,3 \times 10^6$	435 μ l
4	$2,4 \times 10^6$	417 μ l
5	$2,1 \times 10^6$	476 μ l

4.2.2 Durchführung eines Intraassays

Für die Erstellung des Intraassays wurde einer gesunden Person an einem Tag fünf 4,7 ml antikoagulatorische Heparin-Blutproben abgenommen. Alle fünf Proben wurden am

selben Tag analog dem Vorgehen in Abschnitt 4.1 parallel analysiert. Wie beim Interassay sollen auch hier reproduzierbare Ergebnisse vorliegen.

Die hier gemessenen Zellzahlen und eingesetzten Mengen an PBMC für 1×10^6 Zellen pro ml sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: Zellzahl und das zugehörige Volumen an PBMC beim Intraassay

Probe	Zellzahl [$\frac{Z}{ml}$]	Eingesetztes Volumen PBMC pro Röhrchen für $1 \times 10^6 \frac{Z}{ml}$
1	$1,2 \times 10^6$	833 μ l
2	2×10^6	500 μ l
3	$1,3 \times 10^6$	769 μ l
4	$2,2 \times 10^6$	455 μ l
5	$1,9 \times 10^6$	526 μ l

Nach der durchflusszytometrischen Messung des Inter- und Intraassays wurden die Messwerte in einer Excel-Tabelle dokumentiert. Anschließend wurde der Variationskoeffizient beider Assays berechnet, um die Präzision der Methode zu beurteilen. Dieser wurde mithilfe der Formel 1 berechnet.

$$VK = \frac{SD}{\bar{x}}$$

Formel 1: Gleichung zur Berechnung des Variationskoeffizienten aus der Standardabweichung (SD) geteilt durch den Mittelwert (\bar{x}).

4.3 Erhebung gesunder Referenzintervalle und statistische Analyse

Für die Erhebung gesunder Referenzintervalle wurden, wie in den vorherigen Kapiteln erklärt, aus dem Blut der 21 Spender*innen die peripheren mononuklearen Blutzellen mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert und nachfolgend permeabilisiert. Anschließend erfolgte die intrazelluläre XIAP-Färbung und nach der sekundären Färbung die Immunphänotypisierung der Lymphozyten-Subgruppen anhand spezifischer Oberflächenmarker. Es wurden vorläufige Referenzintervalle der XIAP-Expression in B-, T- und NK-Zellen erstellt.

Nach der Messung wurden die Messwerte für das Isotyp-Röhrchen und das XIAP-Röhrchen in einer Excel-Tabelle dokumentiert und mithilfe dieses Programms der Mittelwert und das 2,5%- bzw. 97,5%- Perzentil berechnet.

Neben dem Mittelwert wurde ebenfalls noch der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Anhand des SEMs lässt sich die Abweichung des gemessenen Mittelwerts vom wahren Mittelwert der Gesamtheit beurteilen. Dabei ist dieser abhängig von der Stichprobengröße, je größer diese ist, desto kleiner wird auch der SEM. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde mithilfe der Formel 2 berechnet [Lee, D. K. et al., 2015].

$$SEM = \frac{SD}{(\sqrt{n})}$$

Formel 2: Gleichung zur Berechnung des SEM. Diese erfolgte über die Standardabweichung geteilt durch die Wurzel von n, wobei n der Größe der Stichprobe entspricht.

Für die graphische Darstellung und die Durchführung der statistischen Tests (Wilcoxon- und Friedman-Test) wurden die Messdaten ebenfalls in das Programm SigmaPlot übertragen. Der Wilcoxon-Test wurde für zwei gepaarte und abhängige Stichproben verwendet. Der Friedman-Test eignet sich dagegen für den statistischen Vergleich von mehr als zwei gepaarten Werten.

5 Ergebnisse

5.1 Validierung der durchflusszytometrischen Methode

5.1.1 Ergebnisse des Interassays

Für den Interassay wurden die isolierten PBMC permeabilisiert und intrazellulär mit dem XIAP- bzw. Isotyp-Antikörper gefärbt. Anschließend folgten die Sekundärmarkierung und die Markierung der Oberflächen der PBMC. Die durchflusszytometrisch gemessenen Werte für den Isotypen und das XIAP-Röhrchen für die T-, B- und NK-Zellen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Dabei gilt, je intensiver eine Probe leuchtet, desto höher ist ihr MFI-Wert [Schmitt, S., 2017].

Tab. 7: Messergebnisse für den Interassay

	B-Zellen		NK-Zellen		T-Zellen	
	Isotyp	XIAP	Isotyp	XIAP	Isotyp	XIAP
	[MFI]	[MFI]	[MFI]	[MFI]	[MFI]	[MFI]
1	496	1216	571	1686	600	1313
2	454	1758	538	2556	564	2021
3	496	1763	655	2359	613	2000
4	435	1042	424	1120	467	946
5	591	1483	688	1802	673	1329
Variationskoeffizient	11%	20%	16%	27%	12%	28%

Die Messergebnisse des Interassays zeigen bei allen Zellen einen kleineren Isotyp-Wert auf als die XIAP+ Zellen, genauso wie es sein sollte. Zur Beurteilung der Methode wird der Variationskoeffizient verwendet, dieser sollte $\pm 20\%$ betragen. Alle Messwerte der B-Zellen erreichen dieses Ziel mit 11% bzw. 20%. Dagegen weisen vor allem die XIAP-positiven NK- und T-Zellen einen höheren Variationskoeffizienten auf. Nur deren Isotyp liegt unter 20%.

Auch weisen die XIAP-positiven B-, T- und NK-Zellen große Schwankungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten zwischen den fünf verschiedenen Blutproben auf.

5.1.2 Ergebnisse des Intraassays

Auch für den Intraassay wurden die PBMC isoliert und intrazellulär mit dem XIAP-Antikörper markiert. Darauf folgte die Sekundärfärbung und die Oberflächenfärbung der Lymphozyten-Subgruppen anhand spezifischer Oberflächenmarker. In Tabelle 8 sind die gemessenen MFI-Werte für den Isotypen und die XIAP+ Zellen dargestellt.

Tab. 8: Messergebnisse des Intraassays

	B-Zellen		NK-Zellen		T-Zellen	
	Isotyp	XIAP	Isotyp	XIAP	Isotyp	XIAP
	[MFI]	[MFI]	[MFI]	[MFI]	[MFI]	[MFI]
1	475	1027	788	1254	874	1327
2	608	1335	878	1985	841	1773
3	670	1043	1160	1645	1149	1439
4	614	1279	871	2089	981	1603
5	767	1217	1247	1699	1094	1644
Variationskoeffizient	15%	11%	18%	17%	12%	10%

Ebenso wie bei dem Interassay sind auch hier die Isotyp-Werte geringer als die der XIAP-positiven Zellen, wie es erwartet wurde. Auch dieser Assay wird anhand des Variationskoeffizienten, der bei $\pm 20\%$ liegen sollte, bewertet. Im Gegensatz zu dem Interassay befinden sich hier alle Variationskoeffizienten zwischen 10% und 18% und erreichen das geforderte Ziel.

Auch sind hier die Schwankungen zwischen den Messwerten der fünf Proben geringer als beim Interassay.

5.2 Erhebung gesunder Referenzintervalle

Für die gesunden Referenzintervalle wurden in einer Excel-Tabelle der Mittelwert, der Standardfehler des Mittelwertes, das 2,5% Perzentil und das 97,5% Perzentil für die Zellpopulationen berechnet. Diese Werte sind in Tabelle 9 zu sehen.

Wie vorausgesetzt, zeigen bei den gesunden Referenzwerten auch die Mittelwerte der Isotypen eine geringere mittlere Fluoreszenzintensität auf als die Mittelwerte der XIAP-positiven Zellen. Dabei sind alle berechneten Werte der B-Zellen am geringsten. Der

Mittelwert des Isotypen ist mit 807 MFI bei den T-Zellen am höchsten, dazu liegt ihr Standardfehler des Mittelwertes bei 54 MFI. Der Isotyp der NK-Zellen hat mit 59 MFI den höchsten SEM. Dagegen sind die XIAP+ NK-Zellen mit einem Mittelwert von 2147 MFI am größten und besitzen auch mit 251 MFI den größten SEM.

Tab. 9: Mittelwert, SEM und die Perzentile für Isotyp und XIAP

	B-Zellen		NK-Zellen		T-Zellen	
	Isotyp [MFI]	XIAP [MFI]	Isotyp [MFI]	XIAP [MFI]	Isotyp [MFI]	XIAP [MFI]
Mittelwert	648	1537	788	2147	807	1820
SEM	51	162	59	251	54	227
2,5%- Perzentil	413	992	484	1081	530	1083
97,5%- Perzentil	1189	3211	1412	4715	1420	4301

Das größte 2,5 % Perzentil haben jeweils die T-Zellen mit 530 MFI beim Isotypen und 1083 MFI bei den XIAP-positiven T-Zellen. Und das kleinste die B-Zellen mit 413 MFI beim Isotypen und 992 MFI bei den XIAP+ B-Zellen.

Auch das 97,5% Perzentil ist bei den B-Zellen jeweils am geringsten. Dagegen hat der Isotyp der T-Zellen mit 1420 MFI unter den Isotypen das größte 97,5% Perzentil und die XIAP+ NK-Zellen unter den XIAP-positiven Zellen mit 4715 MFI das größte 97,5 % Perzentil.

Somit ergibt sich für die XIAP-positiven B-Zellen ein Referenzintervall von 992-3211 MFI, für die XIAP+ NK-Zellen von 1081-4715 MFI. Das Referenzintervall der XIAP-positiven T-Zellen liegt dagegen bei 1083-4301 MFI.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass ein Referenzwert in den Perzentilen, also im Referenzintervall liegen und mindestens doppelt so hoch wie der Isotyp sein muss.

5.2.1 Statistischer Vergleich des Isotypen mit den XIAP-Werten

In Abbildung 5 ist ein grafischer Vergleich der gemessenen Isotyp-Werte mit den gemessenen XIAP-Werten jeweils für die B-, NK- und T-Zellen zu sehen. Dabei stellt jeder Punkt in dem Diagramm einen der 21 Messwerte dar. Zusammengehörende XIAP- und Isotyp-Werte eines Probanden sind mit einer Geraden verbunden.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die XIAP-Werte bei allen Zellarten größer sind als die Isotyp-Werte. Bei einigen Werten bei den NK-Zellen ist der Unterschied zwischen den XIAP+ Zellen und dem Isotyp am größten, erkennbar durch die Steigung der Geraden zwischen den Punkten. Während sich alle Messwerte in dem Bereich 500 – 3000 MFI befinden, gibt es einen auffälligen Messwert jeweils bei den XIAP-positiven Zellen, der sehr viel größer als der zugehörige Isotyp-Messwert ist und sich bei den Zellarten zwischen 4000 und 7000 MFI befindet.

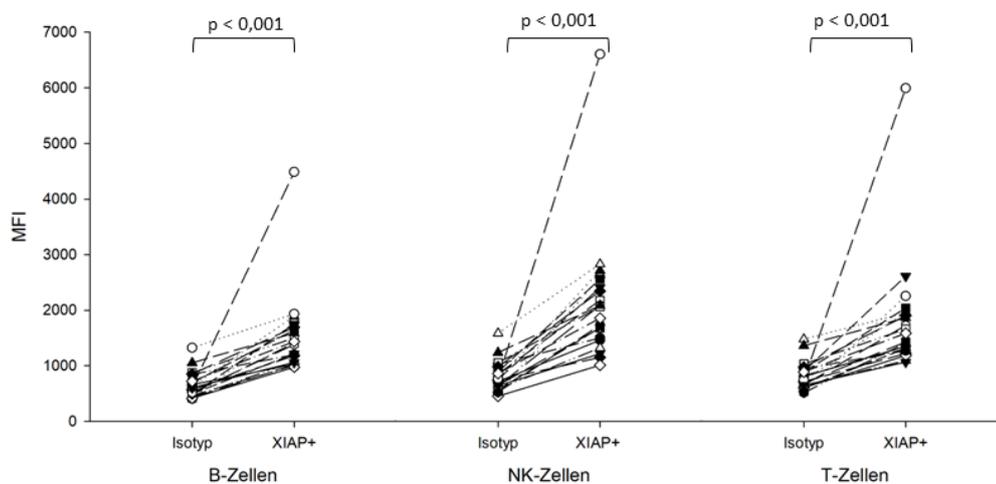


Abb. 5: Grafischer Vergleich des Isotypen mit dem XIAP-Röhrchen für die B-, NK- und T-Zellen. Jeder Punkt stellt einen der Messwerte, gemessen in der mittleren Fluoreszenzintensität dar. Dabei sind die zugehörigen Isotyp- und XIAP-Messwerte verbunden. p beschreibt den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Isotyp- und XIAP-Werten der jeweiligen Zellart. Der p -Wert wurde durch den Wilcoxon-Test berechnet.

Zur statistischen Bewertung der Messwerte wurden diese in das Programm SigmaPlot kopiert und anschließend ein Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser ergibt als positive Rangsumme T^+ einen Wert von 231 und als negative Rangsumme T^- einen Wert von -0. Daraus folgt eine Teststatistik von 231. Somit wird der statistisch signifikante

Unterschied der Isotyp- und der XIAP-Werte bei einem Signifikanzniveau von 0,05 bei allen Zellarten mit einem Wahrscheinlichkeitswert (p-Wert) von $< 0,001$ bewertet.

5.2.2 Statistischer Vergleich der XIAP-Werte der Zellpopulationen

Die Abbildung 6 zeigt die gemessenen XIAP-Werte der B-, NK- und T-Zellen im Vergleich. Dabei wurde jeweils eine Gerade verwendet, um die Messwerte für jede Zellart eines Probanden zu verbinden.

Die mittlere Fluoreszenzintensitäten der XIAP-positiven Zellen befinden sich zwischen 1000 und 3000 MFI. Zudem zeigen die XIAP+ NK-Zellen aller Probanden eine erhöhte MFI im Vergleich zu den anderen beiden Zellarten. Auch hier ist wie in Abbildung 5 eine Auffälligkeit zu sehen. Die Messwerte eines Probanden sind sowohl für die B- und NK-Zellen als auch für die T-Zellen wesentlich höher, zwischen 4000 und 7000 MFI als bei den restlichen Messwerten.

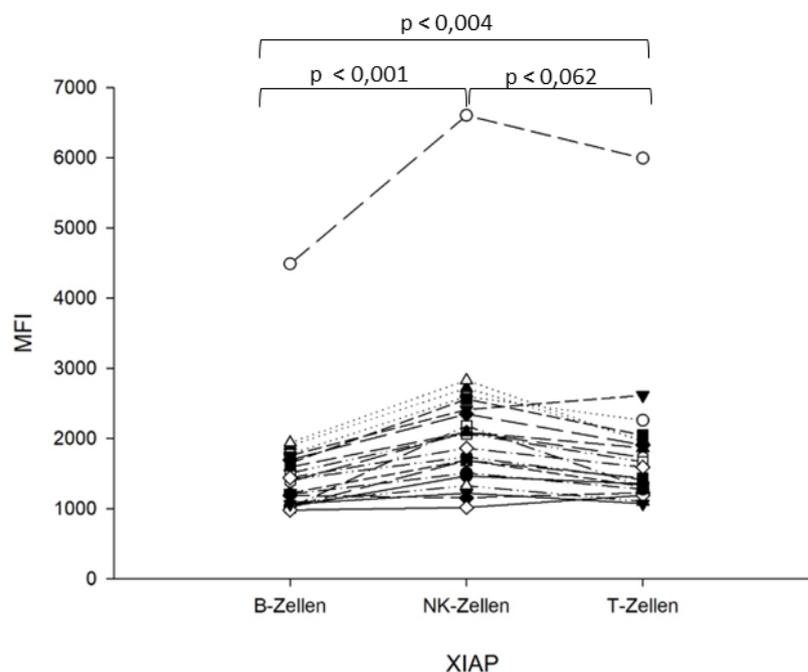


Abb. 6: Grafischer Vergleich der XIAP-Werte der B-, NK- und T-Zellen. Gemessen in der mittleren Fluoreszenzintensität sind die Werte einer Person mit einer Geraden verbunden. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen den B- und NK-, den B- und T-, den NK- und T-Zellen ist durch den p-Wert beschrieben. Dieser wurde zuerst mit dem Friedman- und nachfolgend mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Die Ergebnisse wurden ebenfalls im Programm SigmaPlot statistisch analysiert. Diesmal wurde zuerst der Friedman-Test durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Wert beträgt dabei 31,143 mit einem Freiheitsgrad von 2. Daraus ergibt sich für den Friedman-Test ein statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ und der Wilcoxon-Test kann nachgeschaltet werden. Dieser bewertet den statistisch signifikanten Unterschied der XIAP-positiven B-Zellen und NK-Zellen bei einem Signifikanzniveau von 0,05 mit $p < 0,001$. Dagegen liegt der signifikante Unterschied der XIAP+ B-Zellen und der XIAP-positiven T-Zellen bei $p < 0,004$. Die XIAP-positiven NK- und T-Zellen wurden dagegen mit $p < 0,062$ verglichen.

6 Diskussion

Das Labor der klinischen Immunologie der Uniklinik Leipzig ist nach der DIN EN ISO 15189 akkreditiert. Laut der Akkreditierung muss jeder neu eingeführte Test validiert werden. Während der Validierung sollen sowohl ein Inter- als auch ein Intraassay erstellt werden. Dabei wird die Präzision der Methode anhand des Variationskoeffizienten bewertet. Außerdem sollen laborinterne Referenzwerte ausgewertet werden.

6.1 Validierung der durchflusszytometrischen Methode

Für die Überprüfung der Richtigkeit und Präzision wurden sowohl ein Intra- als auch ein Interassay durchgeführt. Beide sollten zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Dieses Kriterium erfüllen sowohl der Intra- als auch der Interassay, wie in Tabelle 7 und 8 aufgezeigt ist.

Während der Etablierung dieser Methode wurde festgelegt, dass die XIAP-Werte mindestens doppelt so hoch wie die Isotyp-Werte sein sollten. Der Isotyp diene wie bei der Etablierung auch bei der Validierung als Negativkontrolle. Da dieser die gleiche schwere Kette, IgG, aufweist wie der primäre XIAP-Antikörper, eignet er sich um den unspezifischen Hintergrund der Messung, also die XIAP-negativen Zellen und die Eigenfluoreszenz der Zellen von den positiven XIAP-Signalen abzugrenzen [Golim, M. A. et al., 2007]. Während der Interassay die Annahme aus der Etablierung erfüllt, ist dies beim Intraassay nicht der Fall. Bei beiden Assays wäre auch das Arbeiten mit Blut von XIAP-defizienten Patienten möglich gewesen, wobei die Messwerte ebenfalls nicht der Annahme aus der Etablierung entsprochen hätten, da bei der XIAP-Defizienz die XIAP-Expression minimiert bzw. gar nicht vorhanden ist. Wichtig war, dass am Ende der Assays reproduzierbare Ergebnisse vorliegen und diese Anforderung wird von beiden Assays erfüllen.

Zur Beurteilung der Ergebnisse des Intra- und Interassays wurde der Variationskoeffizient als Kriterium verwendet. Dabei wurde die Grenze des Koeffizienten auf $\pm 20\%$ festgelegt, um den Richtlinien der Akkreditierung zu entsprechen.

Sowohl der Isotyp als die XIAP-positiven Zellen weisen bei dem Intraassay einen kleineren Variationskoeffizienten als $\pm 20\%$ auf und erfüllen somit das Kriterium. Beim Interassay ist dies dagegen nicht bei allen Werten der Fall. Hier liegen vor allem die XIAP+ T- und NK-Zellen etwas über der 20%-Grenze. Da sich der Variationskoeffizient aus der Standardabweichung geteilt durch den Mittelwert der Messwerte berechnen lässt, können für einen größeren Variationskoeffizienten als $\pm 20\%$ einmal die größeren Schwankungen innerhalb der Messungen des Interassays ursächlich sein. Diese sind darauf zurückzuführen, dass das Blut für den Assay an unterschiedlichen Tagen abgenommen und analysiert wurde. Aufgrund der biologischen Varianz und der Sterblichkeit der Zellen ändert sich die Zusammensetzung des Blutes bei jedem Menschen täglich und führt demnach auch zu abweichenden Ergebnissen. Es werden beispielsweise jeden Tag ungefähr 10^9 Lymphozyten neu gebildet [Kaufmann, S. H. E., 2014]. Auch der jeweilige Gesundheitszustand zum Zeitpunkt der Blutabnahme kann Einflüsse auf die Ergebnisse haben. Befindet man sich beispielsweise in einer Erkältungsphase können die NK-Zellen erhöht sein, die den viralen Infekt bekämpfen. Somit wäre auch die Zahl der XIAP+ NK-Zellen höher als im gesunden Zustand.

Auch präanalytische Faktoren wie z.B. die Wahl des Antikoagulans oder der Probentransport und die Lagerung, sowie die Probenaufarbeitung haben Einflüsse auf die durchflusszytometrische Messung. So kann beispielsweise jeder Zentrifugenschritt innerhalb eines Waschschrtes zum Verlust einiger Zellen führen. In dieser Arbeit wurden alle Blutproben im Labor der klinischen Immunologie abgenommen und nur max. 24 h bei Raumtemperatur gelagert, weswegen die Auswirkungen auf die Messung aufgrund dieser Aspekte eher gering sein sollte. Dennoch sollte in Zukunft, vor allem wenn die Blutabnahme in anderen Institutionen erfolgt, darauf geachtet werden, dass die Proben richtig gelagert und transportiert werden, umso schnell wie möglich analysiert werden zu können, ohne dass die Variabilität der Zellen oder die Zellzahl vermindert wird [Dorn-Beineke, A. et al., 2016].

Auch die Messung selbst hat Einfluss auf die Untersuchungen. Dies liegt unter anderem an dem Gating während der durchflusszytometrischen Methode. Wenn Gates zu eng oder zu weit um die Zellwolken gefasst wurden, kann es vorkommen, dass eigentlich positive Zellen unbeachtet bleiben oder negative Zellen als positiv betrachtet werden und dies die

Ergebnisse verfälscht. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass die richtigen Gates miteinander verknüpft werden. Jedoch ist in diesem Versuch das Gating nur minimal problematisch, da die Lymphozytenpopulationen stabile Zellwolken bilden und somit mussten die Gates in dem Messprotokoll kaum angepasst und verschoben werden, wenn sie einmal richtig eingestellt wurden.

Außerdem ist die Durchflusszytometrie nicht so sensitiv wie z.B. eine Polymerase-Kettenreaktion [Domingo, E. et al., 2010].

Zwar wurden alle Versuche von demselben Experimentator durchgeführt, jedoch kann es auch hier zu kleinen Abweichungen in der Durchführung und somit zu veränderten Ergebnissen kommen, beispielsweise bei der Länge des Vortexens zwischen den einzelnen Arbeitsschritten.

6.2 Erhebung gesunder Referenzintervalle

Zur statistischen Analyse der Messwerte wurde von 21 Personen Blut abgenommen und dieses auf XIAP analysiert. Anschließend wurden der Friedman- und der Wilcoxon-Test durchgeführt, um Aufschlüsse über die Signifikanz der Messwerte zu geben. Zusätzlich wurden die Perzentile der Messwerte berechnet.

Gesunde Referenzwerte dienen während der Validierung einer medizinischen Methode zur Einordnung zukünftiger Messungen. Sie geben Auskunft darüber, ob die erhaltenen Ergebnisse pathologisch sind oder nicht, um aus diesem Wissen die weitere Therapie abzuleiten. Zur Erstellung der Referenzwerte wurden bestimmte Perzentile der gesunden Proben berechnet. Diese teilen die Messwerte in 100 gleich große Teile, also in 1% Fragmente ein. Dabei stellt das 2,5%-Perzentil die untere Grenze und das 97,5%-Perzentil die obere Grenze des festgelegten Referenzbereichs dar. Nach Vorgabe der Internationalen Vereinigung für Klinische Chemie und Labormedizin (IFCC) sollte ein Referenzintervall den zentralen Anteil, also 95% der Grundgesamtheit einschließen. Daher wurden die Grenzen auf 2,5% und 97,5% festgelegt. Die IFCC rät außerdem dazu, mindestens 120 Referenzwerte zu analysieren, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten [Lucke, S., 2013; Altman, D. G. et al., 1994]. Dies war jedoch aufgrund des zeitlichen Rahmens der Bachelorarbeit von 12 Wochen nicht zu schaffen.

Die bei der Validierung erhaltenen Referenzbereiche durch die Perzentile sollen in Zukunft als Grundlage für die Messungen in der Routinediagnostik dienen. Wobei die

gesunden XIAP-positiven Zellen eine mindestens doppelt so hohe mittlere Fluoreszenzintensität aufweisen müssen als deren zugehörige Isotypen. Zusätzlich dazu, müssen die gesunden Messwerte innerhalb des Intervalls liegen. Bei der Beurteilung zukünftiger Messungen muss jedoch beachtet werden, dass die Werte der Gesunden mit einer 95%-Sicherheit im Referenzbereich liegen. Dies bedeutet aber auch, dass die restlichen 5% der gesunden Werte außerhalb des Bereichs liegen und somit ein abweichender Messwert nicht unbedingt auf eine Krankheit hindeutet. Dies erschwert die Beurteilung, ob ein Messwert als pathologisch gilt oder nicht. Bei Einzelmessungen kann man sicher entscheiden, ob ein Wert pathologisch ist oder nicht, wenn sich dieser weit entfernt vom Referenzbereich befindet. Demnach sollten Messwerte, die sich nah an den Bereichsgrenzen befinden als potenziell pathologisch betrachtet werden [Walz, B. et al., 2015].

Bei dem statistischen Vergleich der XIAP-Werte mit den zugehörigen Isotyp-Werten der jeweiligen Zellpopulation handelt es sich um zwei abhängige Stichproben, die nicht normalverteilt sind. Deswegen war hier die Durchführung des Wilcoxon-Tests notwendig [Herrmann, D., 1984]. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim statistischen Vergleich der XIAP-Werte zwischen den T-, B- und NK-Zellen um drei gepaarte Stichproben, die ebenfalls nicht normalverteilt sind. Folgend musste hier zuerst der Friedman-Test und nachfolgend der Wilcoxon-Test angewandt werden [Liu, J. et al., 2022].

Zur Beurteilung der Signifikanz wird der p-Wert genutzt. Dieser lässt darauf schließen, ob die Nullhypothese abgelehnt wird oder nicht, wobei die Nullhypothese aussagt, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Stichproben gibt. Das dabei festgelegte Signifikanzniveau von 5 % ist ein Standard bei diagnostischen Methoden. Um als statistisch signifikant zu gelten, muss der p-Wert unter dem Signifikanzniveau von 5% liegen [Thiese, M. S. et al., 2016].

Der statistische Vergleich der Isotypen mit den XIAP-positiven Zellen ergibt für jede Zellpopulation einen p-Wert von 0,001 und liegt somit unter dem Signifikanzniveau, demnach wird hier die Nullhypothese abgelehnt und es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten. Dies entspricht den Erwartungen. Aufgrund der Tatsachen, dass die verwendeten Blutproben von gesunden, nicht XIAP-defizienten

Personen, stammten und jeder gesunde Mensch XIAP intrazellulär exprimiert und der Isotyp durch seine Rolle als Negativkontrolle die XIAP-negativen Zellen darstellt, mussten die XIAP-Werte signifikant höher sein als die Werte des Isotyps.

Bei dem statistischen Vergleich der XIAP-Werte der Zellpopulationen liegen nur der p-Wert vom Vergleich der B- und NK-Zellen bzw. B- und T-Zellen miteinander mit 0,001 und 0,004 unter dem Signifikanzniveau und lehnen demzufolge die Nullhypothese ab. Somit ergibt sich für diesen Vergleich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied. Dabei ist die XIAP-Expression in den NK-Zellen signifikant höher als in den B-Zellen. Genauso ist auch die XIAP-Expression in den T-Zellen signifikant höher als in den B-Zellen. Dagegen liegt der p-Wert des Vergleichs der NK- und der T-Zellen bei den XIAP+ Zellen über dem Signifikanzniveau und die Nullhypothese wird im Gegensatz zu den anderen Vergleichen angenommen. Dadurch ergibt sich für den Vergleich der NK- und T-Zellen keinen signifikanten Unterschied. Das bedeutet, die XIAP-Expression in den NK-Zellen ist zwar höher als die in den T-Zellen, jedoch nicht signifikant höher.

Die verschiedenen Ergebnisse könnten auf die unterschiedlichen Lebenszeiten der T-, B- und NK-Zellen zurückzuführen sein. Außerdem scheinen NK-Zellen an sich mehr XIAP zu exprimieren als die anderen Lymphozyten.

6.3 Anwendung in der Diagnostik

Eine fehlende oder verminderte XIAP-Expression in den T-, B- und NK-Zellen lässt, wie in der Einleitung erwähnt, auf den Immundefekt XLP2 schließen. Doch was bedeutet eine Überexpression des XIAP-Proteins?

In der Literatur wird eine Überexpression von XIAP in den meisten Fällen mit verschiedenen Krebsarten wie z.B. Nieren-, Brust- oder Blasenkrebs, aber auch mit hämatologisch Malignomen in Verbindung gebracht, gerade auch wenn die Proben aus Tumorgewebe genommen wurden [Russell, L. G. et al., 2022]. Die Hauptaufgabe von XIAP liegt in der Inhibition der Caspasen und somit auch in der Hemmung der Apoptose. Demzufolge kann eine Überexpression an XIAP im Tumorgewebe zu einer Resistenz der Tumorzellen gegen apoptotische Reize und Krebsmedikamente in der Krebstherapie führen. Daraus folgt eine schlechtere Prognose für Krebspatienten mit einer XIAP-Überexpression in der Krebstherapie. Aus diesem Grund ist XIAP zu einem attraktiven Ziel in der Krebstherapie geworden und wird entsprechend erforscht. Medikamente, die

XIAP zur Verhinderung der Krebsprogression anvisieren, sind vor allem Antisense-Oligonukleotide und niedermolekulare Antagonisten. Antisense-Oligonukleotide sind dabei meistens „short hairpin“-Ribonukleinsäuren (shRNS) oder „small interfering“-RNS (siRNS), die an die Boten-RNS (mRNS) von XIAP binden und diese stumm schalten oder die Stabilität beeinflussen. Dies führt zu einem verminderten XIAP-Protein-Spiegel. Die Schwierigkeit bei dieser Anwendung besteht darin, die RNS, ohne dass sie ihre Effizienz verlieren, *in vivo* in die Zellen zu übertragen. Niedermolekulare Antagonisten sind synthetische Verbindungen, die kompetitiv an XIAP binden und somit die Caspase-Aktivität beeinflussen. Am vielversprechendsten sind dabei die mimetischen „Second mitochondria-derived activator of caspases“ (von Mitochondrien abgeleiteten zweiten Aktivatoren von Caspasen; SMAC)-Proteine. Das sind mitochondriale Intermembranproteine. Diese Proteine werden von den Mitochondrien im Falle von Zelltodsignalen freigesetzt. Anschließend binden sie an XIAP und inaktivieren es, somit kann die Apoptose nicht mehr inhibiert werden [Mizutani, Y. et al., 2007; Gao, X. et al., 2019; Abbas, R. et al., 2020; Tu, H. et al., 2020].

Nach Tu und Costa kann XIAP nicht nur in Krebserkrankungen erhöht sein, sondern wird auch bei vielen anderen Erkrankungen hochreguliert. Durch diese Hochregulierung wird die zelluläre Toleranz gegenüber Entzündungen, Läsionen oder auch Zytotoxizität erhöht [Tu, H. et al., 2020]. In einer Studie hatten Forscher beispielsweise Ratten einer Axotomie unterzogen, das bedeutet, die Axone des Sehnervs wurden absichtlich durchtrennt, dies entspricht einer mutwillig zugefügten Läsion. Infolgedessen unterliefen die retinalen Ganglienzellen dem apoptotischen Zelltod. Bei diesen Zellen handelt es sich um die einzigen Neuronen, die die visuellen Signale über den Sehnerv weitergeben. Es wurde ein adenoviraler Vektor verwendet, um die retinalen Ganglienzellen nach der Sehnerv-Axotomie in Ratten zu überführen. Dabei erfolgte die Vektorapplikation am Sehnervstumpf, um sicherzugehen, dass nur verletzte Neuronen transduziert wurden. Die Vektoren codierten XIAP und aufgrund der XIAP-Überexpression des Vektors wurden die Neuronen nach der Axotomie vor der Apoptose geschützt. In vorangegangenen Studien ist es ebenfalls gelungen Neuronen aus dem Hippocampus nach einer vorübergehenden Ischämie, also einer fehlenden Durchblutung des Gewebes, die einen Sauerstoffmangel der Zellen zur Folge hat, durch XIAP-Überexpression zu schützen [Kügler, S. et al., 2000].

In Abbildung 5 und 6 fällt ein Proband mit sehr hohen XIAP-Expressionen im Vergleich zu den anderen Probanden auf. Trotzdem ist es unwahrscheinlich, dass dieser Proband erkrankt ist. Dieser Versuch ist ein diagnostischer Test, der zu einem bestimmten Ergebnis führt. In der klinischen Immunologie ist es nicht möglich anhand des Ergebnisses des diagnostischen Tests eine wirkliche diagnostische Aussage in Bezug auf die Pathogenität des Messwertes zu treffen. Denn diese Methode liefert in der Krankheitsbefundung nur einen diagnostischen Baustein in der komplexen diagnostischen Kaskade. Das heißt, der Test kann nur Hinweise auf eine Erkrankung geben, für eine sichere Diagnose müssen mehrere Faktoren übereinstimmen. Dies ist beispielsweise die Anamnese des Arztes in der Krankheitsfindung, zusätzlich zu anderen Tests der klinischen Chemie und schlussendlich auch der Immunologie. Und erst wenn alle durchgeführten Tests Hinweise auf die Erkrankung geben, ist diese auch wahrscheinlich. Bei der XIAP-Defizienz können beispielsweise genetische Analysen zum Nachweis krankheitsverursachender Mutationen hinzugezogen werden.

Innerhalb des Praxis- und Bachelormoduls ist es gelungen, eine geeignete durchflusszytometrische Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen zu etablieren und zu validieren. Der Test erfüllt dabei die wichtigsten Kriterien für die klinische Routinediagnostik, denn er ist schnell und einfach durchführbar. Dennoch erfordert nicht nur die Durchflusszytometrie beim Einstellen der passenden Instrumentensettings oder auch der richtigen Gating-Strategie Fachwissen und Erfahrung, sondern auch die Befundung der Tests. Denn wie bereits erwähnt, gibt dieser keine konkrete Aussage über die Pathologie und demnach ist es wichtig, gerade auch bei Grenzwerten, über den Tellerrand zu blicken.

7 Ausblick

Nach der erfolgreichen Etablierung und Validierung dieser Methode kann sie zukünftig in der Routinediagnostik angewandt werden. Dazu wurde über die genaue Durchführung der Methode eine SOP geschrieben, diese ist im Anhang zu sehen. Dabei sollte beachtet werden, dass weitere Test, wie beispielsweise genetische Sequenzanalysen, nötig sind, um eine eindeutige Diagnose bei einer XIAP-Defizienz zu formulieren.

In der Literatur gibt es die Empfehlung, alle Patienten, die im Verdacht stehen eine XIAP-Defizienz zu haben, der durchflusszytometrischen Methode zu unterziehen. Da die Testergebnisse schnell verfügbar sind und somit schnell über die Behandlungsmöglichkeiten entschieden werden kann, während man auf die bestätigenden Ergebnisse der Sequenzanalysen wartet. Außerdem wird die Empfehlung gegeben, auch Personen zu testen, die keine veränderte XIAP-Expression aufweisen, aber dem klassischen Phänotyp entsprechen [Gifford, C. E. et al., 2014].

Während der Validierung wurden die Referenzwerte anhand von Proben von 20-63 Jahre alten Menschen gewonnen. Das heißt, für jüngere oder ältere Patienten fehlen alterskorrigierte Normwertbereiche für zukünftige Messungen. In weiteren Versuchen sollten demnach zusätzliche Referenzwerte von anderen Altersgruppen geschaffen werden, um anhand dieser Intervalle spätere Messungen beurteilen zu können.

Die XIAP-Defizienz tritt aufgrund ihres X-chromosomal rezessiven Erbgangs bei Männern auf. In dieser Arbeit bestand die Kohorte jedoch größtenteils aus Frauen, daher sollten noch weitere Referenzwerte von männlichen Probanden erstellt werden.

8 Zusammenfassung

Bei der XIAP-Defizienz, auch XLP2 genannt, handelt es sich um eine lebensbedrohliche primäre Immunschwächekrankheit, deren frühzeitige Diagnose wichtig ist, um die kranken Patienten möglichst schnell auf ihre Behandlung vorbereiten zu können. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die zuvor etablierte durchflusszytometrische Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen zu validieren.

Dazu wurde ein Intra- und ein Interassay erstellt. Außerdem wurden 21 Referenzwerte von gesunden Personen erstellt und statistisch ausgewertet.

Für die Versuche wurden den Personen jeweils 4,7 ml Heparin-Blut abgenommen. Während beim Interassay fünf Blutproben derselben Person an unterschiedlichen Tagen analysiert wurden, wurden für den Intraassay fünf Blutproben derselben Person am selben Tag parallel analysiert. Das Ziel beider Assays war die Beurteilung der Präzision der Methode mithilfe des Variationskoeffizienten.

Für die Versuche wurden zuerst die peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) aus dem Vollblut mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Für die intrazelluläre Färbung mit dem XIAP-Antikörper wurden die PBMC zuerst für 40 min permeabilisiert. Nach einem Waschschrift konnte nun der XIAP-Antikörper in die Zellen eingeschleust werden. Gleichzeitig wurde auch eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt. Da sowohl der XIAP-Antikörper als auch der Isotyp nicht Farbstoff konjugiert waren, wurden diese anschließend mit einem sekundären FITC-Antikörper markiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde wieder zweimal gewaschen. Zuletzt erfolgte die Immunphänotypisierung der T-, B- und NK-Zellen durch die Markierung der Oberflächenrezeptoren mit Anti-CD3-PerCP, Anti-CD16/56-PE-Cy, Anti-CD19-APC-R700 und Anti-CD45-V500-c. Zum Messen wurden die Proben dann in 500 µl Medium aufgenommen.

Für die Beurteilung der Präzision des Intra- und Interassays wurde der Variationskoeffizient berechnet. Dieser sollte $\pm 20\%$ betragen. Das Kriterium wird von allen Messwerten des Intraassay erfüllt. Dagegen sind beim Interassay die XIAP-positiven NK- und T-Zellen mit 27% bzw. 28% außerhalb des Kriteriums. Die höheren

Variationskoeffizienten sind auf die Schwankungen innerhalb der Messungen aufgrund der biologischen Varianz zurückzuführen.

Nach der Messung der XIAP-Expression in T-, B- und NK-Zellen der 21 gesunden Probanden ergaben sich folgende vorläufige Referenzintervalle:

Für die XIAP+ B-Zellen liegen die Referenzwerte zwischen 992 bis 3211 MFI. Bei den XIAP-positiven NK-Zellen befinden sich dagegen die Referenzwerte zwischen 1081 bis 4715 MFI und bei den XIAP+ T-Zellen zwischen 1083 bis 4301 MFI. Dabei zeigte sich, dass die XIAP-Expression in den NK-Zellen signifikant höher ist als in den B-Zellen. Dabei ist sie im Vergleich zu der XIAP-Expression in den T-Zellen zwar höher, jedoch nicht signifikant. Die XIAP-Expression in den B-Zellen ist signifikant niedriger als in den T-Zellen.

Die erhobenen Referenzintervalle werden helfen, künftige Patientendaten in Hinsicht auf ihre pathologischen Werte einschätzen zu können. Damit die hier erfolgreich etablierte und validierte durchflusszytometrische Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen ein hilfreiches diagnostisches Werkzeug in der Diagnostik der X-gekoppelten proliferativen Erkrankung bilden kann, wurde die genaue Durchführung in einer Standardarbeitsanweisung dokumentiert.

9 Summary

The XIAP deficiency, also known as XLP2, is a primary life-threatening immunodeficiency disease. Early diagnosis is important in order to prepare the patients as quickly as possible for their treatment. Therefore, the aim of this study was to validate the previously established flow cytometric method for XIAP-detection on T-, B- and NK-cells. For this purpose, an intra- and interassay was performed as well as the creation of 21 healthy reference values for statistical analysis.

For the experiments, 4,7 ml of heparin blood were taken from the subjects. The blood for the interassay was taken on five different days from the same subject. In contrast, five blood samples from the same subject were taken and analyzed on the same day for the intraassay. The aim of both assays was to assess the precision of the method using the coefficient of variation.

First, the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood. For this, a density gradient centrifugation was performed. For the intracellular staining with the XIAP-antibody, the PBMC were permeabilized for 40 min. After a washing step, the cells could now be infiltrated by the XIAP-antibody. At the same time, an isotype control was carried out. Both, the XIAP- and the isotype- antibody were not conjugated with dyes, they were subsequently labeled with a secondary FITC-antibody. After an incubation for 30 min, the samples were washed twice. Last, the immunophenotyping of T-, B- and NK-cells was carried out by labeling the surface receptors with anti-CD3-PerCP, anti-CD16/56-PE-Cy, anti-CD19-APC-R700 und anti-CD45-V500-c. For measurement, the samples were taken in 500 µl medium.

The coefficient of variation was calculated to assess the precision of the intra- and Interassay. This should be $\pm 20\%$. The criterion is met by all measurements of the intraassay. In contrast, the XIAP-positive NK- and T-cells, as well as their stain indices, are 27% and 28% outside the defined range. The higher coefficients of variation are due to the variations within the measurement due to biological variance.

After measuring XIAP-expression in T-, B- and NK-cells of the 21 healthy subjects, the following provisional reference intervals were obtained:

For the XIAP+ B cells, the reference values range from 992 to 3211 MFI. For XIAP-positive NK-cells, on the other hand, the reference values are between 1081 and 4715 MFI and for XIAP+ T-cells between 1083 and 4301 MFI. It was shown that XIAP expression in NK-cells is significantly higher than in B-cells. Compared to XIAP-expression in T-cells, it is higher, but not significant. XIAP-expression in B-cells is significantly lower than in T-cells.

The collected reference intervals will help to assess future patient data with regard to their pathological values. In order to make the successfully established and validated flow cytometric method for XIAP detection on T-, B-, and NK cells a useful diagnostic tool in the diagnosis of the X-linked lymphoproliferative disease, the exact execution was documented in a standard operating procedure.

Literaturverzeichnis

Abbas, R. et al. (2020): *Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death-The Story of ARTS and SMAC*, Cells 3. DOI: 10.3390/cells9030663. PubMed-ID: 32182843.

Adan, A. et al. (2017): *Flow cytometry: basic principles and applications*, Critical reviews in biotechnology 2. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876. PubMed-ID: 26767547, S. 163–176.

Al-Rubeai, M. (2004): *Apoptosis*, Kluwer Academic: S. 10.

Altman, D. G. et al. (1994): *Quartiles, quintiles, centiles, and other quantiles*, BMJ (Clinical research ed.) 6960. DOI: 10.1136/bmj.309.6960.996. PubMed-ID: 7950724, S. 996.

Domingo, E. et al. (2010): *Enhanced sensitivity of flow cytometry for routine assessment of minimal residual disease*, Haematologica 4. DOI: 10.3324/haematol.2009.018911. PubMed-ID: 19951967, S. 691–692.

Dorn-Beineke, A. et al. (2016): *Qualitätskontrolle und Validierung in der diagnostischen Durchflusszytometrie*, LaboratoriumsMedizin 2. DOI: 10.1515/labmed-2015-0083, S. 65–79.

Filipovich, A. H. et al. (2010): *X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins?*, Blood 18. DOI: 10.1182/blood-2010-03-275909. PubMed-ID: 20660790, S. 3398–3408.

Gao, X. et al. (2019): *Prognostic Value of XIAP Level in Patients with Various Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis*, Journal of Cancer 6. DOI: 10.7150/jca.28229. PubMed-ID: 31031863, S. 1528–1537.

Gifford, C. E. et al. (2014): *Clinical flow cytometric screening of SAP and XIAP expression accurately identifies patients with SH2D1A and XIAP/BIRC4 mutations*, Cytometry Part B: Clinical Cytometry 4. DOI: 10.1002/cyto.b.21166, S. 263–271.

Girardelli, M. et al. (2015): *The diagnostic challenge of very early-onset enterocolitis in an infant with XIAP deficiency*, BMC pediatrics. DOI: 10.1186/s12887-015-0522-5. PubMed-ID: 26671016, S. 208.

Goetz, C. et al. (2018): *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*, Springer International Publishing: S. 15-27.

Golim, M. A. et al. (2007): *Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo*, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 4. DOI: 10.1590/S1516-84842007000400008.

Hallenberger, L. (2021): *Die Rolle von X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in der Systematischen Sklerose*, 63 Seiten, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Medizinische Fakultät, Dissertation: S. 11.

- Herrmann, D. (1984): *Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik — 30 BASIC-Programme*, Vieweg+Teubner Verlag: S. 51.
- Horn, P. C. (2014): *Charakterisierung des XIAP-Gens bei zwei Familien mit X-chromosomalen lymphoproliferativen Syndrom*, 65 Seiten, Leipzig, München, Universität Leipzig; Technische Universität München, Medizinische Fakultät, Dissertation: S. 18-21.
- Jäger, L. (1978): *Grundlagen der Klinischen Immunologie*, Vieweg+Teubner Verlag: S. 208.
- Kaufmann, S. H. E. (2014): *Basiswissen Immunologie*, Springer Berlin Heidelberg: S. 9.
- Kostic, A. D. et al. (2014): *The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead*, *Gastroenterology* 6. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.009. PubMed-ID: 24560869, S. 1489–1499.
- Kügler, S. et al. (2000): *The X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) prevents cell death in axotomized CNS neurons in vivo*, *Cell death and differentiation* 9. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400712. PubMed-ID: 11042676, S. 815–824.
- Latour, S. (2007): *Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome*, *Current opinion in allergy and clinical immunology* 6. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3282f1bad6. PubMed-ID: 17989527, S. 510–514.
- Latour, S. et al. (2015): *XIAP deficiency syndrome in humans*, *Seminars in cell & developmental biology*. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.01.015. PubMed-ID: 25666262, S. 115–123.
- Lee, D. K. et al. (2015): *Standard deviation and standard error of the mean*, *Korean journal of anesthesiology* 3. DOI: 10.4097/kjae.2015.68.3.220. PubMed-ID: 26045923, S. 220–223.
- Lentze, M. J. et al. (2003): *Pädiatrie*, Springer Berlin Heidelberg: S. 622-629.
- Liu, J. et al. (2022): *T-Friedman Test: A New Statistical Test for Multiple Comparison with an Adjustable Conservativeness Measure*, *International Journal of Computational Intelligence Systems* 1. DOI: 10.1007/s44196-022-00083-8.
- Lucke, S. (2013): *Methoden zur Bestimmung von medizinischen Referenzbereichen für labordiagnostische Parameter*, 163 Seiten, Greifswald, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Institut für Biometrie und Medizinische Informatik, Dissertation: S. 1, 23.
- Luttmann, W. et al. (2014): *Der Experimentator: Immunologie*, Springer Berlin Heidelberg: S. 77, 90, 97.
- Macey, M. G. (2007): *Flow cytometry*, Humana Press: S. 1.
- Marsh, R. A. et al. (2009): *A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency*, *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 5. DOI: 10.1002/cyto.b.20473. PubMed-ID: 19288545, S. 334–344.
- Martin, M. et al. (2009): *Immunologie*, Ulmer: S. 6-245.

- McKinnon, K. M. (2018): *Flow Cytometry: An Overview*, Current protocols in immunology. DOI: 10.1002/cpim.40. PubMed-ID: 29512141, S. 5.1.1-5.1.11.
- Mengy, S. S. (2021): *Evaluation der Wertigkeit klinischer Warnzeichen für Immundefekte sowie Untersuchung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires mittels Vβ-Spectratyping bei Kindern mit malignen und nicht malignen Erkrankungen vor und nach Stammzelltransplantation*, 160 Seiten, Hamburg, Universität Hamburg, Medizinische Fakultät, Dissertation: S. 22.
- Mizutani, Y. et al. (2007): *Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis*, International journal of oncology 4. PubMed-ID: 17332931, S. 919–925.
- Mudde, A. C. A. et al. (2021): *Evolution of Our Understanding of XIAP Deficiency*, Frontiers in pediatrics. DOI: 10.3389/fped.2021.660520. PubMed-ID: 34222142, S. 660520.
- Müller, N. C. (2018): *Characterization of the role of XIAP in modulating inflammatory death and its consequences*, 111 Seiten, München, Technische Universität München, Fakultät für Medizin, Dissertation: S. 3 f.
- Murphy, K. M. et al. (2018): *Janeway Immunologie*, 9. Auflage, Springer Spektrum: S. 543, 696 f, 715 f, 727, 1002.
- Pachlopnik Schmid, J. et al. (2011): *Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency)*, Blood 5. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298372. PubMed-ID: 21119115, S. 1522–1529.
- Przewoznik, M. (2011): *Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von natürlichen Killerzellen in einem murinen Spontan-Tumormodell*, 67 Seiten, München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Medizinische Fakultät, Dissertation: S. 4 ff.
- Rackwitz, H. (2022): *Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zum XIAP-Nachweis auf T-, B- und NK-Zellen*, 29 Seiten, Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Praxismodulbericht: S. 11-14.
- Resch, K. et al. (2010): *Immunopharmakologie*, Ulmer: S. 12-27.
- Rink, L. et al. (2012): *Immunologie für Einsteiger*, Spektrum Akad. Verl.: S. 23 ff., 186.
- Russell, L. G. et al. (2022): *Increased migration and motility in XIAP-null cells mediated by the C-RAF protein kinase*, Scientific reports 1. DOI: 10.1038/s41598-022-11438-8. PubMed-ID: 35562367, S. 7943.
- Schmidt, R. F. et al. (2005): *Physiologie des Menschen*, 29., vollst. neu bearb. und aktualisierte Aufl., Springer Medizin Verlag Heidelberg: S. 539-542.
- Schmitt, S. (2017): *Das Phänomen (Durchfluss)- Zytometrie*, Wiley Analytical Science Magazine.
- Thakker, P. (2021): *T cell intrinsic and extrinsic role of XIAP, during CD8 T cell response against intracellular pathogens*, 129 Seiten, Ottawa, University of

Ottawa, Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology,
Masterarbeit: S. II.

Thiese, M. S. et al. (2016): *P value interpretations and considerations*, Journal of thoracic disease 9. DOI: 10.21037/jtd.2016.08.16. PubMed-ID: 27747028, S. E928-E931.

Tu, H. et al. (2020): *XIAP's Profile in Human Cancer*, Biomolecules 11. DOI: 10.3390/biom10111493. PubMed-ID: 33138314.

Walz, B. et al. (2015): *Der Referenzbereich ist tot - es lebe der Reference Change Value*, Therapeutische Umschau. Revue therapeutique 2. DOI: 10.1024/0040-5930/a000655. PubMed-ID: 25630296, S. 130–135.

Anhang

Universitätsklinikum Leipzig A&R Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 1 von 8

Standardarbeitsanweisung Nr.: SOP 4-482		
Titel: Nachweis XIAP		
Version: 01	<i>Pfad: Workgroups (W): →IMU →Imm →Diag →Akkreditierung →03 SOP, FRM, QMH, Aufkleber, Anfoschein →SOP4 → gültige SOP →SOP 4-482 Nachweis XIAP</i>	
Überprüfung:		
Änderungsgrund: Veränderungen siehe gelbe Markierung		
Dieses Dokument ersetzt: -		
Erstellt durch:		
	Datum:	Unterschrift:
Geprüft durch:		
	Datum:	Unterschrift:
Freigegeben durch:		
(gültig ab)	Datum:	Unterschrift
Verteiler: 1. Original, Labor B008		
Anzahl der Anlagen: keine		

Universitätsklinikum Leipzig AöR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/ Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 2 von 8

Inhalt	Seite
SOP 4-482.01 Titel	3
SOP 4-482.02 Geltungsbereich	3
SOP 4-482.03 Änderungshinweise	3
SOP 4-482.04 Zweck / Definitionen / Allgemeines	3
SOP 4-482.05 Testprinzip	3
SOP 4-482.06 Verfahrenskendaten / Validierung / Qualitätskontrolle	3
SOP 4-482.06.1 Validierung	3
SOP 4-482.06.2 Qualitätskontrolle intern	4
SOP 4-482.06.3 Qualitätskontrolle extern	4
SOP 4-482.07 Material / Geräte	4
SOP 4-482.07.1 Reagenzien	4
SOP 4-482.07.2 Verbrauchsmaterial	4
SOP 4-482.07.3 Geräte	5
SOP 4-482.08 Durchführung der Analyse	5
SOP 4-482.08.1 Probenentnahme / Präanalytik	5
SOP 4-482.08.2 Probenvorbereitung	5
SOP 4-482.08.3 Kalibrierung / Geräteeinstellung	6
SOP 4-482.08.4 Messung	6
SOP 4-482.08.5 Auswertung	6
SOP 4-482.08.6 Befundung / Übermittlung der Ergebnisse	7
SOP 4-482.09 Mitgeltende Unterlagen	7
SOP 4-482.10 Literatur	8
SOP 4-482.11 Anlagen	8

Universitätsklinikum Leipzig AöR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 3 von 8

SOP 4-482.01 **Titel**
Nachweis XIAP

SOP 4-482.02 **Geltungsbereich**
Routinediagnostik, Bereich Immundiagnostik des Instituts für Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Leipzig AöR, Department für Diagnostik

SOP 4-482.03 **Änderungshinweis**
Zusammenfassung aller Veränderungen

SOP 4-482.04 **Zweck / Definitionen / Allgemeines**
Im gesunden Menschen wird XIAP („X-linked inhibitor of Apoptosis Protein“) durch das *BIRC4*-Gen codiert und reguliert die Apoptose. Aufgrund von Mutationen in diesem Gen wird XIAP bei einer XIAP-Defizienz, auch XLP2 genannt gar nicht oder nur vermindert exprimiert. Personen mit dieser Immunschwächeerkrankung sind anfälliger gegenüber Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus. Weitere Leiden der Patienten sind hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CID) oder eine Lymphomproliferation.

SOP 4-482.05 **Testprinzip**
Der Test bietet die Möglichkeit der durchflusszytometrischen Bestimmung der XIAP-Expression in Lymphozyten anhand eines emittierten Fluoreszenzsignals. Dabei werden CD3+ T-Zellen, CD16+ und CD56+ NK-Zellen und CD19+ B-Zellen intrazellulär gefärbt. Nach der anschließenden Sekundärmarkierung und einer zusätzlichen Oberflächenfärbung können die Zellen nun durchflusszytometrisch gemessen werden. Die Antikörper gegen XIAP (Mouse Anti-XIAP) sowie CD3+ T-Zellen, CD16+ und CD56+ NK-Zellen und CD19+ B-Zellen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind so ausgewählt, dass sie nach Anregung Fluoreszenzsignale generieren, die im Zytometer getrennt ausgewertet werden können. Gleichzeitig werden über die Lichtstreuung physikalische Parameter, wie Zellgröße und Granularität, gemessen. Es wird eine Messung mit einem Isotypen (Mouse IgG) als Negativkontrolle zusätzlich zu der XIAP-Probe durchgeführt. Anhand der Negativkontrolle wird die Eigenfluoreszenz bzw. Grundfluoreszenz der T-, B- und NK-Zellen definiert und die Gates danach ausgerichtet. Diese Einstellungen werden dann für die XIAP-Probe übernommen. Zur Bewertung der XIAP-Expression wird die mittlere Fluoreszenzintensität der XIAP positiven CD3+, CD16+ und CD56+ und CD19+ Zellen berechnet und ausgewertet.

SOP 4-482.06 **Verfahrenskenndaten / Validierung / Qualitätskontrolle**
SOP 4-482.06.1 **Validierung**

Die Ermittlung laborinterner Normalwertbereiche wurde an normalen Kontrollprobanden durchgeführt.
Die Normwerttabellen und alle dazu gehörigen Daten sind unter: W:\IMU\Imm\Diag\Akkreditierung\04 Validierung\ Validierung Validierung XIAP abgelegt.

Der Nachweis der Präzision beschreibt die Reproduzierbarkeit der Methode. Die wurde jeweils mittels eines Intraassay- und Interassayvergleiches durchgeführt.

Intraassay: Es wurde jeweils eine Probe 5x präpariert und gemessen. Daraus wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Das Ziel ist ein gemessener Variationskoeffizient, der kleiner ist als der erwartete Variationskoeffizient von 20 %.

Universitätsklinikum Leipzig AoR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 4 von 8

Interassay: Es wurde je 1 Probe an fünf unterschiedlichen Tagen präpariert und gemessen. Es wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Das Ziel ist ein gemessener Variationskoeffizient, der kleiner ist als der erwartete Variationskoeffizient von 20 %.

Die Messprotokolle aller Validierungsmessungen werden im durchflusszytometrischen Labor archiviert.

SOP 4-482.06.2 Qualitätskontrolle intern

- Durchführung der täglichen Kalibrierung des Durchflusszytometers nach SOP 2-424

SOP 4-482.06.3 Qualitätskontrolle extern

- bisher extern keine Qualitätskontrolle mittels Ringversuch möglich

SOP 4-482.07 Material / Geräte

SOP 4-482.07.1 Reagenzien

Bezeichnung	Standort	Lager-temp. (°C)	kommerziell	eigene Herstellung	Verwendung einzeln
CD3 PerCP	Kühlschrank 1 Fach 3	2 – 8 °C	BD Biosciences	Antikörper für gebrauchsfertige Lösung mischen	5 µl
CD16-PE-Cy7	Kühlschrank 1 Fach 3	2 – 8 °C	BD Biosciences		5 µl
CD56-PE-Cy7	Kühlschrank 1 Fach 3	2 - 8 °C	BD Biosciences		5 µl
CD19-APC-R700	Kühlschrank 1 Fach 3	2 – 8 °C	BD Horizon		2,5 µl
CD45-V500-c	Kühlschrank 1 Fach 3	2 - 8 °C	BD Biosciences		2,5 µl
Mouse Anti-XIAP	Kühlschrank Raum B001 Fach 4	-20 °C	BD Transduction Laboratories		2,5 µl
Mouse IgG Isotyp	Kühlschrank 1 Fach 3	2 – 8 °C	BD Biosciences		0,5 µl
FITC Goat Anti-Mouse	Kühlschrank 1 Fach 3	2 – 8 °C	SouthernBiotech		2,5 µl
Fix/Perm Buffer (4x)	Kühlschrank 1 Fach 5	2 - 8 °C	BD Biosciences		
Verdünnungspuffer	Kühlschrank 1 Fach 5	2 - 8 °C	BD Biosciences		
Perm/Wash Buffer (5x)	Kühlschrank 1 Fach 5	2 - 8 °C	BD Biosciences		
PBS/5% FKS	Kühlschrank 1 Fach 5	2 - 8 °C		SOP 4-401	

SOP 4-482.07.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Standort	Firma
Pipettenspitzen	Labortisch Raum B008	Fa. Sarstedt
FACS-Röhrchen (12x75 PS-Röhrchen)	Regal über Labortisch Raum B 008	Fa. Falcon

SOP 4-482.07.3 Geräte

Bezeichnung	Standort	Firma	Bedienung/ Kalibrierung
Hämatologie-Analysesystem XP 300	Raum B 008	Sysmex/Köbe	

Universitätsklinikum Leipzig AöR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 5 von 8

Vortex-Mischer	Labortisch Raum B 008	Fa. Heidolph	SOP 2-406
variable Pipetten für die Bereiche 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Labortisch Raum B 008	Gilson	SOP 2-402
Kühlzentrifuge Rotana 46	Raum B 008	Fa. Hettich	SOP 2-412
BD FACSLyric	Raum B 007	BD Biosciences	SOP 2-424

SOP 4-482.08 Durchführung der Analyse**SOP 4-482.08.1 Probenentnahme / Präanalytik**

Es werden 4,7 ml antikoaguliertes Blut (bevorzugt Heparin-Blut) in das Max-Bürger-Zentrum, immundiagnostisches Labor eingesandt, zwischenzeitlich bei Raumtemperatur asserviert und spätestens am Folgetag nach der Blutentnahme untersucht. Es erfolgt eine Eingangsprüfung und Annahme laut SOP 1-008.

SOP 4-482.08.2 Probenvorbereitung

- Präparation der PBMC aus Heparin-Blut (siehe SOP 4-421)
- Messen der Zellzahl am Sysmex
- FACS-Röhrchen beschriften (Röhrchen 1: XIAP, Röhrchen 2: Isotyp)
- Einstellen der Zellzahl auf 1×10^6 Z/ml pro Röhrchen
- Herstellung 1x Fix/Perm Buffers:
 - 500 µl Fix/Perm Buffer (4x) mit 1,5 ml Verdünnungspuffer mischen
- Zugabe von 1 µl 1x Fix/Perm Buffer, vortexen
- 40 min Inkubation im Kühlschrank bei 2-8 °C im Dunkeln
- Herstellung 1x Perm/Wash Buffers:
 - 5,28 ml Perm/Wash (5x) mit 21,12 ml Aqua dest. mischen
- Zugabe von 1 ml 1x Perm/Wash Buffers, vortexen
- Zentrifugation 6 min bei 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 2 ml 1x Perm/Wash Buffers, vortexen
- Zentrifugation 6 min bei 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 100 µl 1x Perm/Wash Buffer
- Zugabe von 2,5 µl Anti-XIAP in Röhrchen 1 und 0,5 µl Isotyp in Röhrchen 2, vortexen
- 40 min Inkubation im Kühlschrank bei 2-8 °C im Dunkeln
- Zugabe von 2 ml 1x Perm/Wash Buffer, vortexen
- Zentrifugation 6 min bei 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 2 ml 1x Perm/Wash Buffer, vortexen
- Zentrifugation 6 min bei 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 100 µl 1x Perm/Wash
- Zugabe von 2,5 µl FITC Goat Anti-Mouse-Antikörper, vortexen
- 30 min Inkubation im Kühlschrank bei 2-8°C im Dunkeln
- Zugabe von 3 ml 1x Perm/Wash, vortexen
- Zentrifugation 5 min bei 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 3 ml 1x Perm/Wash, vortexen
- Zentrifugation 5 min bei 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von je 5 µl CD3-PerCP, CD16-PE-Cy7, CD56-PE-Cy7 und je 2,5 µl CD19-APC-R700 und CD45-V500-c, vortexen
- 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und im Dunkeln
- Zugabe von 1 ml PBS/5% FKS, vortexen
- Zentrifugation 5 min 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 1 ml PBS/5% FKS, vortexen
- Zentrifugation 5 min 350 x g, Überstand abgießen, Pellet vortexen
- Zugabe von 500 µl PBS/5% FKS, vortexen

Universitätsklinikum Leipzig AöR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 6 von 8

- Messen

SOP 4-482.08.3 Kalibrierung / Geräteeinstellung

Das Zytometer FACSLyric ist entsprechend SOP 2-424 zu kalibrieren. Dabei wird eine „Performance QC“ und anschließend ein „Assay and Tube Setting Set-up“ mittels CST-Beads durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgt immer vor Beginn der arbeitstäglichen Messung. Der detaillierte Arbeitsablauf ist, in der am Gerät ausliegenden Anlage „Täglicher Arbeitsablauf“, beschrieben. Bei Nichtdurchführung der täglichen CST-Bead Kalibrierung wird automatisch, die bestehende Kalibrierung des Vortages den Messungen zu Grunde gelegt.

SOP 4-482.08.4 Messung

- FACSLyric per Knopfdruck starten
- Computer am FACSLyric einschalten
- Windows Log-In:
 - Username: eigener Benutzername
 - Passwort: eigenes Passwort
- FACSuite Software starten,
 - Username: BAdministrator
 - Passwort: bdadministrator und Häkchen bei „I acknowledge...“ setzen
- Einschaltoutine laut SOP 2-424 sowie Anlage „Täglicher Arbeitsablauf“ durchführen
- Worklist – New – Worklist Entries – Task – XIAP (aktuelle Versionsnummer) – in Feld Sample ID reinklicken und Auftragsnummer scannen
- Anzahl Tasks entsprechend der Probenanzahl wie beschrieben einladen ODER: Fenster Task – User Defined – XIAP (aktuelle Versionsnummer) – im Feld „Number“ (rechts unten) Anzahl zusätzlicher Kopien eingeben – Add
- In erste Sample ID reinklicken und Nummern durchscannen
- File – Rename - Datum und Tagesnummer eingeben z.B. 210330_001 für 30.03.2021 1.Worklist
- Röhrchen entsprechend der Nummerierung A1 beginnend in 40 Tube Rack stellen
- Rack in den Loader des Lyric stellen und Deckel verschließen
- Fenster Worklists – RUN – Load carrier
- Kriterien zur Kontrolle der korrekten Messung: Kontrolle, ob im Dotplot CD45 V500-C-a vs. SSC alle Zellen im Gate eingeschlossen sind
- Nach Beendigung der Messung: Remove carrier - Continue
- Schließen der aktuellen Worklist
- Export der Messdaten: Manage Worklist – Aktuelle Worklist anklicken – File – Export Worklist – with data - W:\Workgroup\IMU\Imm\Diag\LYRIC\Worklist Rohdaten – Save
- Optional: Nach Messung Ausschaltoutine durchführen (siehe SOP 2-424) oder Anlage „Täglicher Arbeitsablauf“

SOP 4-482.08.5 Auswertung

- Worklist importieren: Worklist – File – Import Worklist – W:\Workgroup\IMU\Imm\Diag\LYRIC\Worklist Rohdaten
- Manage Worklist – Doppelklick auf Workliste -
- Kriterien zur Analyse:
 - **Tube Isotyp:**

Universitätsklinikum Leipzig AöR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 7 von 8

- Plot SSC-A vs. CD45 V500-C-A (CD45+): Leuko-Gate auf Leukozyten setzen, Lympho-Gate eng auf CD45+Lymphozyten setzen
 - Plot CD16/56 PE-Cy7-A vs. CD3 PerCP-A (Leerwert-CD16/56+ und CD3+): Gate setzen auf C16+CD56+ Lymphozyten (CD16/CD56+) und auf CD3+ Lymphozyten (CD3+)
 - Plot CD19 APC-R700-A vs. CD3 PerCP-A (Leerwert-CD19+): Gate setzen auf CD19+ Zellen (CD19+)
 - **Tube XIAP:**
 - Plot SSC-A vs. CD45 V500-C-A (CD45+): Leuko-Gate auf Leukozyten setzen, Lympho-Gate eng auf CD45+Lymphozyten setzen
 - **ACHTUNG:** alle weiteren Gates werden automatisch anhand der Einstellungen aus Tube Leerwert gesetzt
 - **3 Histogramme:**
 - Vergleich mittlere Fluoreszenz der XIAP-positiven Zellpopulationen des XIAP-Tube und des Isotyp-Tube
- Fenster Work Entries – Approve – weiterklicken auf nächste Sample ID und Vorgang wiederholen
 - Worklist schließen – Manage Worklist – ausgewertete Workliste anklicken – File – Export Worklist – with data - W:\Workgroup\IMU\Imm\Diag\LYRIC\Worklist ausgewertet – save -
 - Manage Worklist – ausgewertete Workliste anklicken - Delete
 - Es erfolgt zusätzlich eine automatische Ablage der Auswertung als PDF-Datei in W:\Workgroup\IMU\Imm\Diag\LYRIC\PDF
 - Die Datenübertragung in das Labordatensystem erfolgt automatisch nach Freigabe in FACSuite („Approve“) über Laufwerk [\s050008046\Lyric](#). Bei Störungen kann die Dateneingabe auch manuell erfolgen

Bei auffälligen Befunden (fehlende Antikörpermarkierung, Subpopulationen etc.) erfolgt die Wiederholung des Ansatzes durch den technischen Mitarbeiter. Bei wiederholten Unstimmigkeiten wird der Laborleiter informiert und nimmt Korrekturmaßnahmen vor.

SOP 4-482.08.6 Befundung / Übermittlung der Ergebnisse

- Messdaten werden automatisch in I-Soft übernommen, erfasst und technisch validiert
- die Befundmaske enthält Normalwertbereiche, die mit gesunden Spendern (Erwachsenen) ermittelt wurden
- Vergleich der Patientendaten mit diesen Normalwerten, Beurteilung erfolgt als frei formulierter Text
- Die Befundübermittlung erfolgt in der Regel via Isoft per Fax oder postalisch, falls nichts anderes vereinbart wurde.

SOP 4-482.09 Mitgeltende Unterlagen

- SOP 1-001 ff
- SOP 2-400 ff
- SOP 4-401
- Laborinterne Kurzanleitung
- Ordner Fallbeispiele
- Ordner Reagenziendokumentation

Universitätsklinikum Leipzig AöR Department für Diagnostik Institut für Klinische Immunologie/ Immundiagnostik Johannisallee 30, 04103 Leipzig	Standardarbeitsanweisung SOP 4-482	Version: 01
	Nachweis XIAP	Seite: 8 von 8

- SOP 1-015 „In-House Herstellung durchflusszytometrischer Tests“
- FRM 1-042 „Titration Antikörper“
- FRM 1-052 „Validierung quantitativer Methoden, Interassay“
- FRM 1-053 „Validierung quantitativer Methoden, Intraassay“
- Ordner Analysezertifikate/MSDS
- Pipettierhilfe: Routinepanel - Lyric

SOP 4-482.10 Literatur

- (1) Mengy S. S. Evaluation der Wertigkeit klinischer Warnzeichen für Immundefekte sowie Untersuchung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires mittels V β -Spectratyping bei Kindern mit malignen und nicht malignen Erkrankungen vor und nach Stammzelltransplantation. Dissertation (2021): 22
- (2) Mudde A. C. A., et al. Evolution of our Understanding of XIAP Deficiency. Front. Pediatr. (2021) 9:660520

SOP 4-482.11 Anlagen

Keine

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 21. Februar 2023

A black rectangular redaction box covering the signature of Hannah Rackwitz.

Hannah Rackwitz