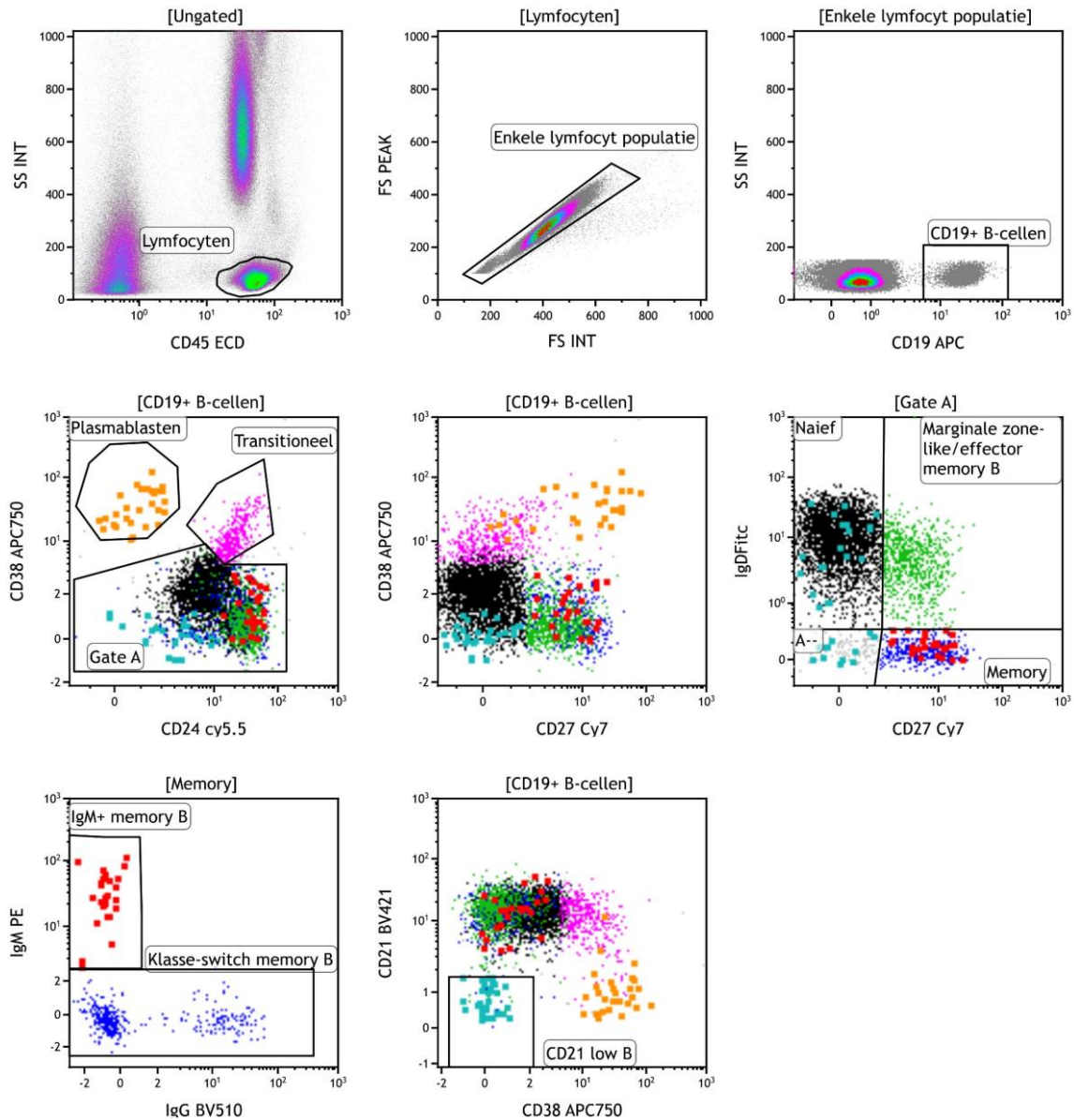


BIJLAGE 1

November 2025, versie 1

Gatingstrategie B-cellen



Voorbeeldanalyse 1. Memory B-cel bepaling is uitgevoerd op bloed van een gezonde controle, waarna data is geanalyseerd met Kaluza software.

Plot 1. De lymfocyten worden geselecteerd op basis van de SSC-A en CD45 expressie.

Plot 2. Op basis van FSC-A en FSC-H worden de doubletten uit de lymfocyt populatie gehaald.

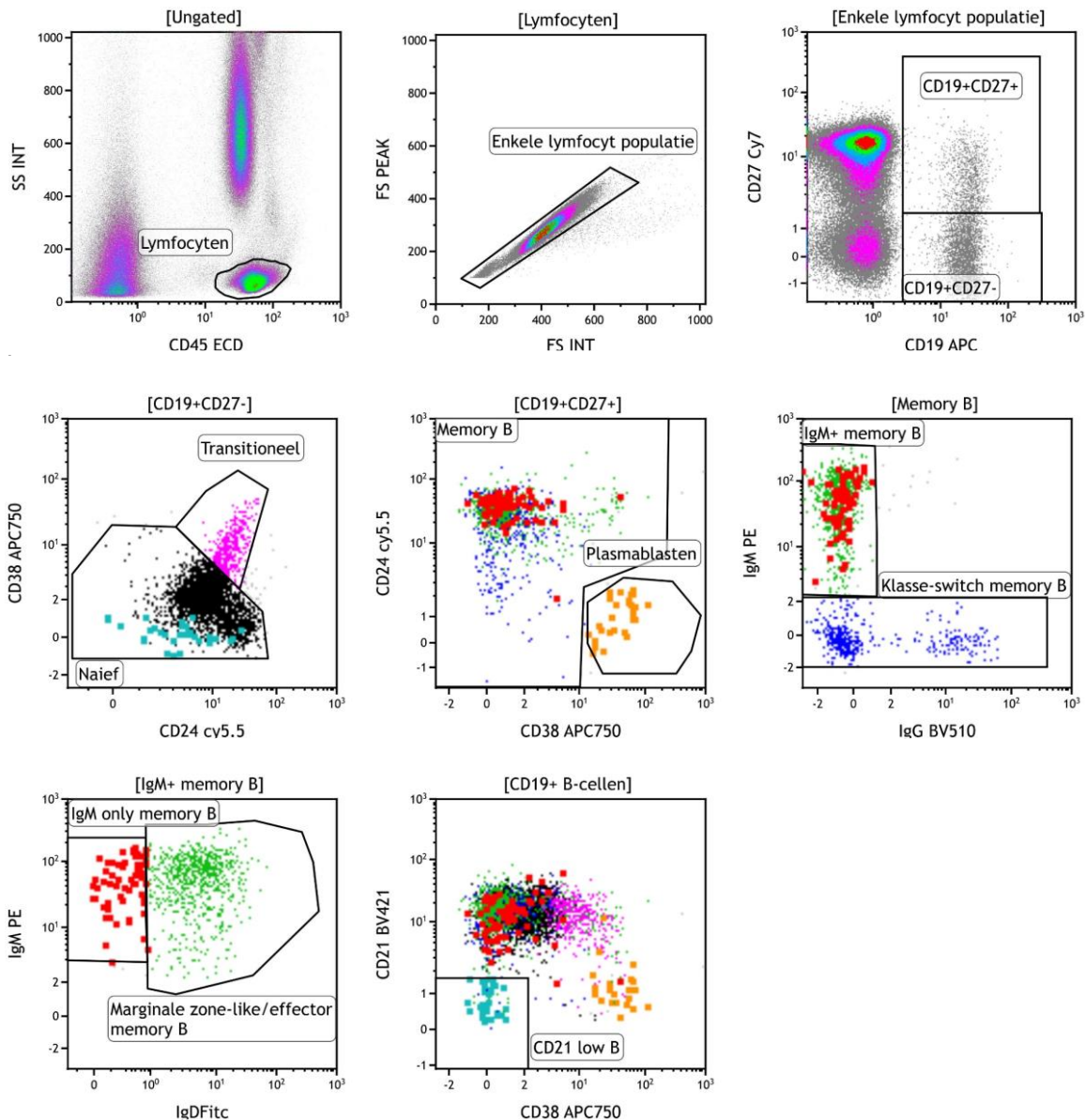
Plot 3. De B-cellen worden geselecteerd op basis van CD19 (en/of CD20) expressie.

Plot 4 en 5. De combinatie van deze twee plots wordt gebruikt om de plasmacellen (in oranje) en de transitionele B cellen (in rose) te gaten. Plot 4 wordt tevens gebruikt om de overige B-cel subsets (in gate A) verder te kunnen gaten zonder de transitionele B cellen en plasmablasten.

Plot 6. In deze plot worden alleen de cellen in gate A vanuit plot 4 weergegeven. Vervolgens worden de CD27 en IgD expressie gebruikt om de naïeve mature B-cellen (zwarte populatie), niet-isotype geswitchte memory B-cellen/marginale zone-like/ effector memory B-cellen (groene populatie), memory B-cellen (blauwe+rode populatie) en CD27⁻ memory B-cellen (linksonder) te definiëren.

Plot 7. Met behulp van de IgM/IgG expressie kan er binnen de memory B-cellen onderscheid gemaakt worden tussen IgM-only memory (rode populatie) en isotype-geswitchte memory B-cellen (blauwe populatie).

Plot 8. De CD21^{low} cellen (in turquoise) worden gedefinieerd op basis van de CD21 en CD38 expressie (CD19⁺CD21⁻CD38⁻).



Voorbeeldanalyse 2. Memory B-cel bepaling is uitgevoerd op bloed van een gezonde controle, waarna data is geanalyseerd met Kaluza software.

Plot 1. De lymfocyten worden geselecteerd op basis van de SSC-A en CD45 expressie.

Plot 2. Op basis van FSC-A en FSC-H worden de doubletten uit de lymfocyt populatie gehaald.

Plot 3. De B-cellen worden geselecteerd op basis van CD19 (en/of CD20) expressie. Vervolgens wordt op basis van CD27 expressie onderscheid gemaakt tussen geactiveerde vs. niet-geactiveerde B-cellen.

Plot 4. Binnen de CD27⁻ B-cellen wordt op basis van CD38 vs. CD24 expressie onderscheid gemaakt tussen de naïeve B-cellen (zwart) en de transitionele B-cellen (rose).

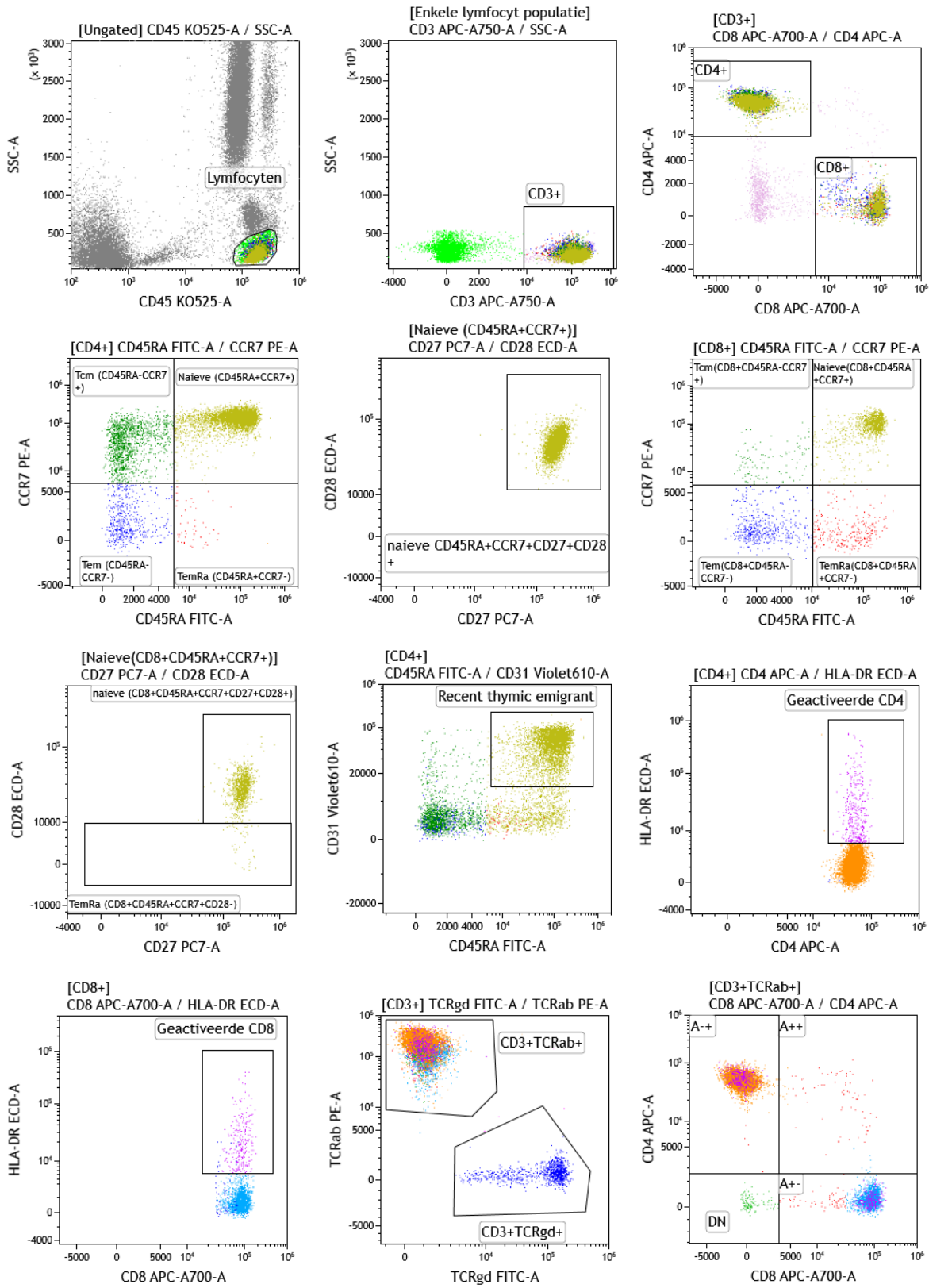
Plot 5. Binnen de CD27⁺ geactiveerde B-cellen kan op basis van CD24 vs. CD38 expressie onderscheid gemaakt worden tussen de plasmablasten (oranje) vs. memory B-cellen.

Plot 6. Met behulp van de IgM/IgG expressie kan er binnen de memory B-cellen onderscheid gemaakt worden tussen IgM⁺ memory B-cellen (groene + rode populatie) en isotype-geswitchte memory B-cellen (blauwe populatie).

Plot 7. Vervolgens kan op basis van IgM vs. IgD expressie onderscheid gemaakt worden tussen de IgM-only memory B-cellen (rode populatie) vs. niet-isotype geswitchte memory B-cellen/marginale zone-like/effector memory B-cellen (groene populatie).

Plot 8. De CD21^{low} cellen (in turquoise) worden gedefinieerd op basis van de CD21 en CD38 expressie (CD19⁺CD21⁻CD38⁻).

Gatingstrategie T-cellen



Voorbeeldanalyse 1. T-cel subset bepaling is uitgevoerd op bloed van een patiënt (zonder afwijkingen), waarna data is geanalyseerd met Kaluza software.

Plot 1. De lymfocyten worden geselecteerd op basis van de SSC-A en CD45 expressie.

Plot 2. De CD3⁺ cellen worden geselecteerd op basis van de SSC-A en CD3 expressie.

Plot 3. Binnen de CD3⁺ T-cellen worden de CD4⁺ en de CD8⁺ T-cellen geselecteerd o.b.v. CD4 en CD8 expressie

Plot 4. Binnen de CD4⁺ T-cellen wordt de CD45RA en CD197 expressie gebruikt om de naïeve (rechtsboven in geel), central memory (linksboven in groen), effector memory (linksonder in blauw) en ver-gedifferentieerde (rechtsonder in rood) T cellen te definiëren.

Plot 5. De naïeve CD4⁺ T cellen moeten CD27 en CD28 tot expressie brengen.

Plot 6. Binnen de CD8⁺ T cellen wordt de CD45RA en CD197 expressie gebruikt om de naïeve (rechtsboven in geel), central memory (linksboven in groen), effector memory (linksonder in blauw) en ver-gedifferentieerde (rechtsonder in rood) T-cellen te definiëren.

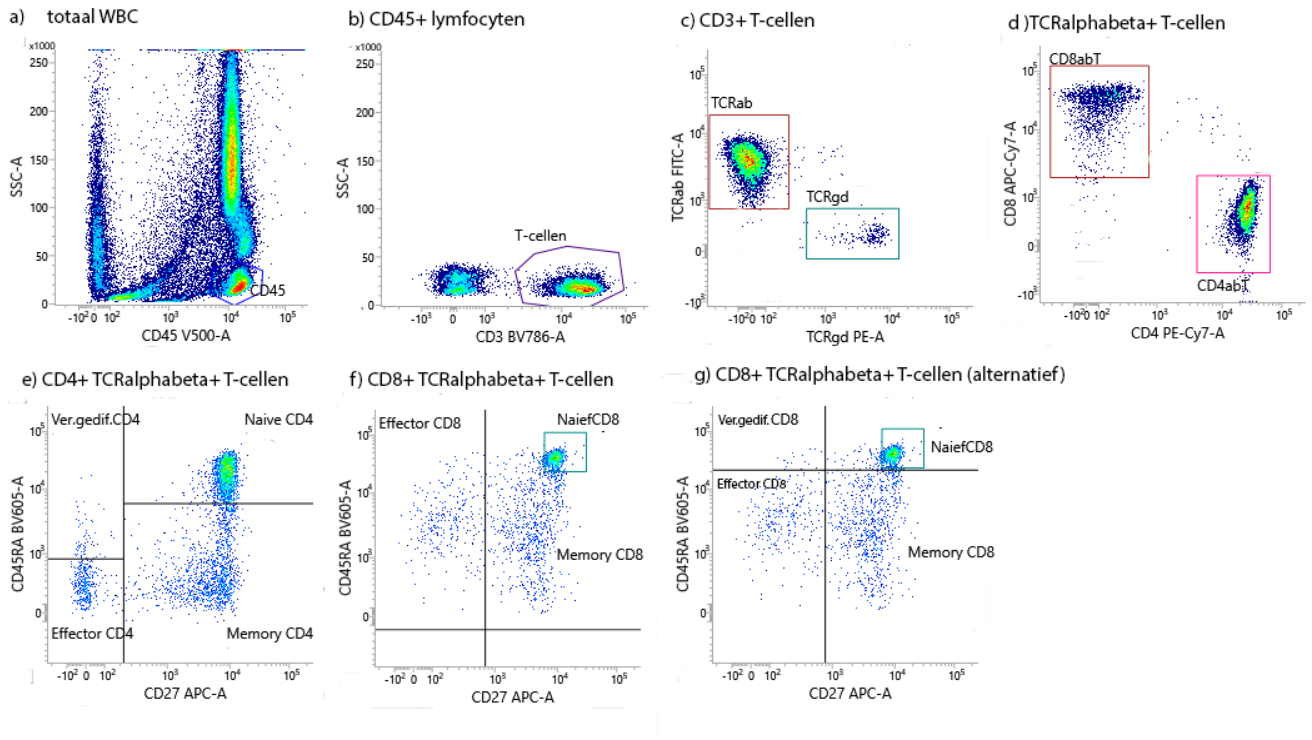
Plot 7. De naïeve CD8⁺ T-cellen moeten CD27 en CD28 tot expressie brengen. De CD45RA⁺CD197⁺CD28⁻ cellen (onderste gate) worden gedefinieerd als de ver-gedifferentieerde T cellen. Deze populatie wordt opgeteld bij de CD45RA⁺CD197⁻ ver-gedifferentieerde T cellen.

Plot 8. Binnen de CD4⁺ T cellen worden de recente thymus-emigranten geselecteerd (CD45RA⁺CD31⁺).

Plot 9 en 10. De geactiveerde CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen worden gedefinieerd op basis van HLA-DR expressie.

Plot 11. De CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen (rechtsboven) en de γδ T-cellen (rechtsonder in blauw) worden binnen de CD3⁺ T-cellen bepaald op basis van expressie van TCRγ en respectievelijk CD4 en CD8.

Plot 12. De dubbel-negatieve (CD4⁻CD8⁻) αβ T-cellen (linksonder in rood) worden gedefinieerd op basis van afwezige expressie van CD4 en CD8.



Voorbeeldanalyse 2. T-cel subset bepaling is uitgevoerd op bloed van een patiënt (zonder afwijkingen), waarna data is geanalyseerd met BD FACSuite.

Plot 1. Lymfocyten worden geselecteerd op basis van CD45 expressie en lage SSC.

Plot 2. T-cellen worden gedefinieerd op basis van CD3 expressie.

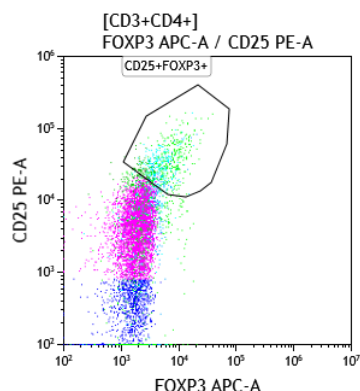
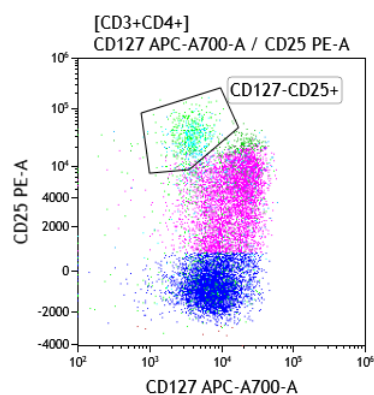
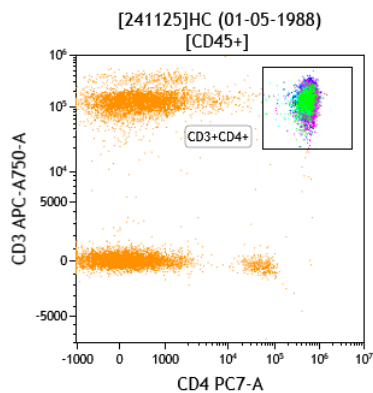
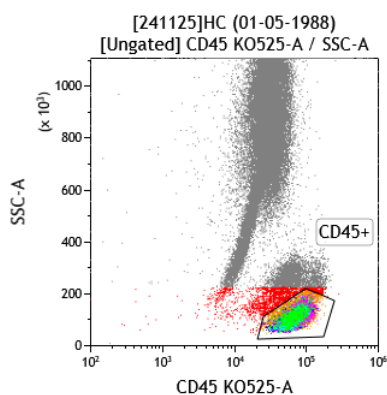
Plot 3. TCR $\alpha\beta$ positieve cellen worden geselecteerd.

Plot 4. Binnen TCR $\alpha\beta$ worden CD4+ en CD8+ cellen geselecteerd. NB. Ook dubbel-negatieve CD4-CD8- cellen kunnen hier worden geanalyseerd, indien gewenst.

Plot 5. Binnen TCR $\alpha\beta$ CD4+ T-cellen worden naïeve (CD27+CD45RA++), memory (CD27-CD45RA-), effector (CD27-CD45RA-) en ver gedifferentieerde (CD27-CD45RA++) cellen gedefinieerd.

Plot 6. Binnen TCR $\alpha\beta$ CD8+ T-cellen worden naïeve (CD27++CD45RA++), memory (CD27+), effector (CD27-) cellen gedefinieerd. NB: Memory CD8+ zijn alle CD27+ CD8+ T-cellen – naïeve CD8+ T-cellen

Plot 7. Alternatieve gating: Binnen TCR $\alpha\beta$ CD8+ T-cellen worden naïeve (CD27+CD45RA++), memory (CD27+CD45RA-), effector (CD27-CD45RA-) en ver gedifferentieerde (CD27-CD45RA++) cellen gedefinieerd.



Voorbeeldanalyse 3. FOXP3+ T-cel bepaling is uitgevoerd op bloed van een patiënt (zonder afwijkingen), waarna data is geanalyseerd met Kaluza software.

Plot 1. De lymfocyten worden geselecteerd op basis van de SSC-A en CD45 expressie.

Plot 2. De CD3⁺CD4⁺ lymfocyten worden geselecteerd op basis van de CD3 en CD4 expressie.

Plot 3. Binnen de CD4 T-cellen worden de CD127⁻CD25⁺ regulatoire T-cellen gedefinieerd op basis van een lage/negatieve CD127 expressie in combinatie met een hoge CD25 expressie.

Plot 4. Binnen de CD4⁺ T cellen worden de FoxP3⁺CD25⁺ regulatoire T-cellen gedefinieerd op basis van een hoge expressie van cytoplasmatisch FOXP3 in combinatie met een hoge expressie van CD25.