



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

# Entwicklung reversibler Fab-Multimere zur Gewinnung und funktionellen Charakterisierung muriner regulatorischer T-Zellen

Marc Joachim Nikolaus

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genemigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dirk H. Busch
2. Univ.-Prof. Dr. Markus Gerhard

Die Dissertation wurde am 18.08.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.05.2016 angenommen.

## Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>14</b>
1.1. ZELLTHERAPIE IN DER IMMUNOLOGIE .....	14
1.2. TREGS (REGULATORISCHE T-ZELLEN) .....	14
1.2.1. Von „Suppressoren“ zu „Regulatoren“ – Geschichte einer Entdeckung .....	14
1.2.2. Phänotypische Charakterisierung, Funktion und Bedeutung von Tregs .....	16
1.2.2.1. nTregs – Fakten und Einordnung .....	16
1.2.2.2. Weitere Suppressoren .....	19
1.2.2.3. Mechanismen der Suppression .....	20
1.2.2.4. Bedeutung von Tregs in Mausmodellen und Autoimmunerkrankungen des Menschen.....	25
1.3. VOM MAUSMODELL ZUM PATIENTEN – ZELLTHERAPIE MIT TREGS .....	27
1.3.1. Prinzipien und Ansätze.....	27
1.3.2. <i>in vivo</i> Aktivierung von Tregs.....	29
1.3.3. Transfer nach <i>ex vivo</i> Aktivierung bzw. Expansion .....	30
1.3.5. Zelltherapeutische Ansätze außerhalb der Transplantationsmedizin .....	32
1.4. PROBLEME DER AUFREINIGUNG .....	35
1.5. DIE ALTERNATIVE – VON MHC-MULTIMEREN ZU FAB-STREPTAMEREN .....	37
1.5.1. MHC-Multimere.....	37
1.5.2. FAB- <i>Streptamere</i> .....	38
1.6. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DIESER ARBEIT .....	40
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>41</b>
2.1. MATERIAL .....	41
2.1.1. Geräteliste .....	41
2.1.2. Chemikalien.....	42

2.1.3. Enzyme .....	44
2.1.4. Kit-Systeme.....	44
2.1.5. Puffer und Lösungen.....	44
2.1.5.1. Allgemeines .....	45
2.1.5.2. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese .....	45
2.1.5.3. Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	45
2.1.5.4. Puffer für Western Blot .....	46
2.1.5.5. Puffer für Silberfärbung.....	46
2.1.5.6. Puffer für periplasmatische Expression.....	47
2.1.6. Medien .....	47
2.1.7. Größenstandards.....	48
2.1.8. Oligonukleotide .....	48
2.1.9. Vektoren .....	50
2.1.10. Antikörper .....	51
2.1.11. Fab Streptamere .....	51
2.1.12. Bakterienstämme.....	52
2.1.13. Zelllinien .....	52
2.1.14. Mäuse .....	52
2.1.15. Software.....	53
2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	53
2.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	53
2.2.1.1. Allgemeines .....	53
2.2.1.2. Mutagenese PCR.....	55
2.2.1.3. Reverse Transkription.....	56
2.2.1.4. RACE-PCR für die halbspezifische Amplifikation von cDNA.....	57
2.2.2. Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	58
2.2.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	58
2.2.4. RNA-Isolierung aus Zelllysaten.....	58
2.2.5. Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	59
2.2.6. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren .....	59

2.2.7. Dpn1-Verdau.....	60
2.2.8. Ethanol-Präzipitation .....	60
2.2.9. Hitzeschocktransformation .....	61
2.2.10. Elektrotransformation .....	61
2.2.11. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	62
2.2.12. CloneJET™ Klonierung.....	62
2.2.13. StarGate® Klonierung.....	63
2.2.14. DNA-Sequenzierung, DNA-Synthese, Sequenzanalyse .....	63
2.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	64
2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	64
2.3.2. Western Blot.....	65
2.3.3. Silberfärbung.....	66
2.4. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	67
2.4.1. Kultivierung der Hybridom-Zelllinien PC61 und GK1.5 .....	67
2.4.2. Proteinexpression .....	68
2.4.3. Proteinaufreinigung .....	68
2.4.4. Präparatorischer Aufschluss und Gewinnung von Lymphozyten aus murinen Organen .....	69
2.4.5. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer .....	70
2.4.6. Polyklonale Stimulation naiver T-Zellen .....	70
2.4.7. Suppression Assay mittels CFSE bzw. eFluor® 670 cell proliferation dye .....	70
2.5. FACS UND FÄRBEMETHODEN .....	71
2.5.1. Multimerisierung muriner Fab-Streptamere .....	71
2.5.2. Antikörperfärbung vs. Streptamer Färbung .....	71
2.5.2.1. Färbung.....	71
2.5.2.2. Ablösung.....	73
2.5.3. CFSE- bzw. eFluor® 670-Färbung .....	73
2.5.4. Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICCS), Foxp3- und KI 67-Färbung .....	74
2.5.5. FACS-Analyse .....	75
2.5.6. FACS-Zellsortierung.....	76

2.6. MAUSEXPERIMENTE.....	77
2.6.1. Diphtherietoxin-vermittelte Treg Depletion in DEREg Mäusen.....	77
2.6.2. Adoptiver Zelltransfer .....	77
2.7. STATISTIK .....	78

### 3. ERGEBNISSE 78

3.1. HERSTELLUNG MURINER ANTI-CD4 UND ANTI-CD25 FAB-STREPTAMERE .....	78
3.1.1. Gewinnung der Einzelkomponenten eines Fab-Fragments mittels PCR.....	79
3.1.1.1. Versuch einer halbspezifischen Amplifikation von $V_H$ , $C_H$ , $V_L \kappa/\lambda$ und $C_L$ mittels RACE-PCR .....	79
3.1.1.2. Spezifische Amplifikation der variablen Regionen $V_H$ und $V_L \kappa$ bzw. $\lambda$ .....	81
3.1.2. Klonierung der Einzelkomponenten zu einem Fab-One-STrEP <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> Fusionsprotein .....	85
3.1.2.1. Donorvektor-Klonierung der variablen Regionen $V_{H\text{PC61}}$ , $V_{H\text{GK1.5}}$ , $V_L \lambda_{\text{PC61}}$ und $V_L \kappa_{\text{GK1.5}}$ .....	85
3.1.2.2. Gen-Synthese der variablen Regionen $V_{H\text{PC61}}$ und $V_L \lambda_{\text{PC61}}$ .....	88
3.1.2.3. Zusammenführung von schwerer Kette ( $V_H+C_H$ ), <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> und leichter Kette ( $V_L+C_L$ ) gegen CD4 und CD25 durch Fusionsklonierungen.....	88
3.1.3. Periplasmatische Expression der anti-CD4 und anti-CD25 Fab-One-STrEP <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> Fusionsproteine.....	91
3.2. TEST MURINER FAB- <i>STREPTAMERE</i> IN FACS-FÄRBUNG UND ZELLSORTIERUNG .....	92
3.2.1. Erste Titration und Einzelfärbung mittels anti-CD4 und anti-CD25.....	92
3.2.2. Ablöse-Tests mit anti-CD4 und anti-CD25 mFab- <i>Streptameren</i> .....	95
3.2.3. Mutationen in der Aminosäuresequenz für Entwurf und Herstellung eines affinitätsmodifizierten, reversiblen anti-CD25 mFab- <i>Streptamers</i> .....	96
3.2.4. mFab Doppelfärbung – Charakteristika von multiplen <i>Streptamer</i> -Färbungen mit murinem anti-CD4 und anti-CD25 .....	99
3.2.5. Robuste <i>Streptamer</i> -Färbungen mit murinem anti-CD4 und anti-CD25 unter verschiedenen Inkubationsbedingungen .....	101
3.2.6. FACS-Zellsortierung nach <i>Streptamer</i> -Färbung mit murinem anti-CD4 und anti-CD25 .....	103
3.2.7. Sortierung Foxp3 <sup>+</sup> T-Zellen – Nachweis für die Färbespezifität der neuen <i>Streptamer</i> -Färbung mit murinem anti-CD4 und anti-CD25 .....	106
3.3. FUNKTIONALITÄT MFAB-STREPTAMER GEFÄRBTER TREGS <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> .....	109

3.3.1. Vergleich suppressiver Eigenschaften von mAb- und mFab-gefärbten nTregs mittels Suppression Assay .....	109
3.3.2. Vergleich der Zellproliferation von mAb- und mFab-gefärbten nTregs .....	112
3.3.3. <i>In vivo</i> Funktionalität: adoptiver Transfer von Tregs .....	113
3.3.4. <i>In vivo</i> Funktionalität: reversibel gefärbte Tregs im DEREK-Mausmodell .....	115
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>119</b>
HERSTELLUNG MURINER ANTI-CD4 UND ANTI-CD25 FAB- <i>STREPTAMERE</i> .....	120
TEST MURINER FAB- <i>STREPTAMERE</i> IN FACS-FÄRBUNG UND ZELLSORTIERUNG .....	122
FUNKTIONALITÄT MFAB- <i>STREPTAMER</i> MARKIERTER TREGS <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> .....	128
AUSBLICK .....	136
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>139</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>141</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>143</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>160</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> RACE-PCR zur halbspezifischen Amplifikation schwerer und leichter Ketten PC61 und GK1.5 .....	80
<b>Abbildung 2:</b> Spezifischer Amplifikation der variablen Regionen $V_H$ und $V_L$ von GK1. ....	82
<b>Abbildung 3:</b> Isolierung von $V_L \lambda_{PC61}$ , der variablen Region der leichter Kette von PC61 .....	84
<b>Abbildung 4:</b> Klonierung der variablen Regionen $V_L \kappa_{GK1.5}$ und $V_L \lambda_{PC61}$ .....	86
<b>Abbildung 5:</b> Donorvektor-Klonierung der variablen Regionen $V_H_{GK1.5}$ nach Mutagenese-PCR.....	87
<b>Abbildung 6:</b> Fusionsklonierungen zur Herstellung muriner Fab-One-STrEP <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> Fusionsproteine gegen CD4 und CD25 .....	90
<b>Abbildung 7:</b> Perioplasmatische Expression der mFab-One-STrEP <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> Fusionsproteine anti-CD4 und anti-CD25.....	92
<b>Abbildung 8:</b> Testfärbung und Titration der murinen Fab- <i>Streptamere</i> (mFab) anti-CD4 und anti-CD25.....	96
<b>Abbildung 9:</b> Ablöseexperiment zum Nachweis der Reversibilität muriner Fab- <i>Streptamere</i> .....	98
<b>Abbildung 10:</b> Generierung des affinitätsmodifizierten reversiblen Fab- <i>Streptamers</i> anti-CD25 .....	98
<b>Abbildung 11:</b> Etablierung multipler mFab- <i>Streptamer</i> -Färbungen .....	103
<b>Abbildung 12:</b> Untersuchung zu Färbereihenfolge und Inkubationsbedingungen .....	105
<b>Abbildung 13:</b> FACS-Zellsortierung nach Fab- <i>Streptamer</i> -Doppelfärbung .....	105
<b>Abbildung 14:</b> Foxp3 Expression zum Nachweis der Färbespezifität der murinen Fab- <i>Streptamere</i> anti-CD4 und anti-CD25 .....	108
<b>Abbildung 15:</b> <i>in vitro</i> : <i>Suppression Assay</i> mAb- und mFab-gefärbter nTregs. ....	113
<b>Abbildung 16:</b> <i>in vitro</i> : IL-2 abhängige Proliferation mAb- und mFab-gefärbter nTreg.....	115
<b>Abbildung 17:</b> <i>in vivo</i> : Adoptiver Transfer kompletter Milzzellfraktionen in C57BL/6 bzw. sortierter Tregs in RAG <sup>-/-</sup> .....	115
<b>Abbildung 18:</b> <i>in vivo</i> : Proliferation reversibel gefärbter Tregs im DEREK-Mausmodell.....	118



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>A</b> .....	
Ab	Antikörper ( <i>antibody</i> )
ACT	Ammoniumchlorid-Tris
c-AMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
ATP	Adenosintriphosphat
<b>B</b> .....	
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
<b>C</b> .....	
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succimidylester
CIA	<i>collage-induced arthritis</i>
C <sub>H</sub>	konstante Region der schweren Kette des Fab-Fragments
C <sub>L</sub>	konstante Region der leichten Kette des Fab-Fragments
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
<b>D</b> .....	
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DEREG	<i>DEpletion of REGulatory T cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA ( <i>double-stranded Deoxyribonucleic acid</i> )
DN-Treg	doppelnegative (CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> ) regulatorische T-Zelle
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
<b>E</b> .....	
EAE	<i>experimental autoimmune encephalitis</i>

ECL	<i>enhanced chemiluminescence technique</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMA	Ethidiummonoazid

## F.....

Fab(-Fragment)	<i>Fragment Antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fc(-Teil)	<i>crystallisable Fragment</i>
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>Fetal calf serum</i> )
FGL2	<i>fibrinogen like protein 2</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
FR	<i>framework region</i>
FSC	<i>forward Scatter</i>

## G.....

GITR	<i>glucocorticoid-induced tumour necrosis factor</i>
GMP	Qualitätssicherungsmanagement ( <i>good manufacturing practice</i> )
GOI	<i>gene of interest</i>
GvHD	<i>graft versus host Disease</i>
GVL	<i>graft versus leukemia</i>

## H.....

HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HvG	<i>host versus graft</i>

## I.....

ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICCS	Intrazelluläre Zytokinfärbung ( <i>intracellular cytokine staining</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
IPEX	<i>immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
iTreg	<i>induced T regulatory cell</i>
i.v.	intravenös

<b>K</b> .....	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
<b>L</b> .....	
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated 1</i>
<b>M</b> .....	
MACS	<i>Magnetically activated cell sorting</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
mFab	<i>murines Fragment Antigen binding</i>
mRNA	<i>Boten-RNA (messenger Ribonucleic acid)</i>
MHC I/II	<i>Major histocompatibility complex class I/II</i>
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
<b>N</b> .....	
Nrp-1	Neuropilin 1
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NOD/Scid	<i>Non-obese diabetic/ severe combined immunodeficiency</i>
nTreg	<i>natural T regulatory cell</i>
<b>O</b> .....	
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
<b>P</b> .....	
PB	<i>Pacific blue™ (6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin)</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
poly-A/G	poly-Adenin/Guanin
PTO	Phosphorothioat
<b>R</b> .....	
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG-1/2	<i>Recombination activating gene 1/2</i>
RIP	<i>rat insulin promoter</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

<b>S</b> .....	
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SIT	Allergen-spezifische Immuntherapie ( <i>specific immunotherapy</i> )
SPR	( <i>surface plasmon resonance</i> )
SSC	<i>sidewards Scatter</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA ( <i>single-stranded Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>T</b> .....	
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
Teff	T-Effektor-Zelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helfer-Zelle
TM	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
Tr1	<i>Type 1 regulatory T cell</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
Tresp	<i>T-responder-Zelle</i>
<b>U</b> .....	
UCBT	Nabelschnurblut-Transplantation ( <i>umbilical cord blood transplantation</i> )
UV	ultraviolett
<b>V</b> .....	
V <sub>H</sub>	variable Region der schweren Kette des Fab-Fragments
V <sub>L</sub>	variable Region der leichten Kette des Fab-Fragments
<b>W</b> .....	
wt	Wildtyp
<b>X</b> .....	
x-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Alle Nukleinbasen wurden gemäß IUPAC Nomenklatur abgekürzt.

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Alle Aminosäuren wurden gemäß der allgemein gültigen Nomenklatur abgekürzt.

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. ZELLTHERAPIE IN DER IMMUNOLOGIE

Die Möglichkeiten zur Manipulation unseres Immunsystems sind denkbar vielfältig. Sie reichen von seiner Aktivierung zur Stärkung der Abwehr pathogener Keime über eine verbesserte Wirksamkeit von Vakzinen und erfolgreiche Bekämpfung von Tumoren bis hin zu einer Substitution durch Transplantation von Knochenmark. Die Suppression des Immunsystems bei Verlust der Selbst-Toleranz, wie es für Autoimmunerkrankheiten, Allergien oder Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen der Fall ist, eröffnet schließlich ein weiteres Anwendungsfeld.

Insbesondere bei diesem Prinzip der Suppression sind Behandelnde wie die Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder Abstoßungsreaktionen bis heute aus historischen Gründen stark auf die systemische und unspezifische pharmakologische Immunsuppression fokussiert. Neue Ansätze in der klinischen Anwendung konnten so bisher noch kaum etabliert werden, obschon sich die Prognose vieler dieser Krankheiten verbessert, die Lebensdauer transplantederter Organe sich inzwischen erheblich verlängert hat und sich Vorteile und Nebenwirkungen medikamentöser Dauerbehandlung bereits die Waage halten (Mottet and Golshayan 2007).

Letztlich jedoch wird heute immer deutlicher, dass trotz etablierter Verfahren gerade diese neuen Ansätze, Methoden der Gen- und Zelltherapie, den Hauptbestandteil einer modernen Generation von Behandlungsmöglichkeiten für Krankheiten und Störungen des menschlichen Abwehrsystems bilden werden.

Eine Möglichkeit unser Immunsystem zellvermittelt zu supprimieren und so überschießende oder fehlgeleitete Immunantworten einzudämmen, bieten regulatorische T-Zellen (Tregs). Diese sollen im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

## 1.2. TREGS (REGULATORISCHE T-ZELLEN)

### 1.2.1. Von „Suppressoren“ zu „Regulatoren“ – Geschichte einer Entdeckung

Neben dem Wissen darüber, wie das Immunsystem in seiner Abwehrfunktion gestärkt werden kann, ist es ebenso von Bedeutung zu wissen, wie Überreaktionen dieses Systems gebremst werden können, um eine Schädigung des Organismus zu vermeiden. Die Aufrechterhaltung dieser sogenannten Selbsttoleranz, der Homöostase des Immunsystems geschieht auf unterschiedlichen Wegen, wobei hier

der T-Zell-vermittelte Suppression in den letzten Jahren wiederholt eine wesentliche Rolle zugesprochen wurde (Sakaguchi, Wing, and Miyara 2007).

Erste Hinweise für eine Zellpopulation, welche pathologische Autoimmunität verhindern konnte, brachten 1969 die Ergebnisse von Nishizuka und Sakakura (Nishizuka and Sakakura 1969), die nach neonataler Thymektomie (Tag 3 nach Geburt) bei Mäusen in der Folge eine Zerstörung der Ovarien beobachteten, welche sich als autoimmun-vermittelte Entzündung herausstellte und bei näherer Untersuchung noch weitere Organe betraf. Diese Entzündung trat jedoch nicht auf, wenn die Thymektomie erst eine Woche oder noch später nach Geburt durchgeführt wurde. In den 70er Jahren fanden Gershon und Kondo (Gershon and Kondo 1970) im Thymus von Mäusen T-Zellen, die sich von T-Helferzellen unterschieden und Immunantworten gegen spezifische Antigene unterdrücken konnten.

Der Weg zur genaueren Charakterisierung dieser sogenannten Suppressor T-Zellen schien bereitet, doch verstummte das Interesse in den darauffolgenden Jahren ebenso schnell, wie es aufgekommen war, da geeignete Marker zur Identifikation und Abgrenzung der Suppressor T-Zellen fehlten. Zusätzlich erschienen in den 80er und frühen 90er Jahren viele Phänomene zur Suppression noch widersprüchlich und durch Entdeckungen wie Zellanergie, klonaler Deletion, durch die Charakterisierung des immunsuppressive Zytokins IL-10 sowie der Tr1 und Th3 Zellen glaubte man zufriedenstellende Erklärungen ohne die Existenz einer Suppressor T-Zelle gefunden zu haben (Kappler, Roehm, and Marrack 1987; Kisielow et al. 1988; Goodnow et al. 1995; O'Garra and Murphy 1994).

Neben dieser Entwicklung wurden dennoch weitere Arbeiten zur Selbsttoleranz und deren Aufhebung veröffentlicht. So zeigten (Penhale et al. 1973), dass mittels Thymektomie und sublethaler Bestrahlung bei adulten Ratten eine Thyreoditis und Diabetes mellitus Typ 1 ausgelöst werden konnten. Die Gabe normaler T-Zellen jedoch, speziell CD4+CD8- Thymozyten, eines syngenen Tieres verhinderte den Ausbruch der Krankheiten (Sakaguchi, Takahashi, and Nishizuka 1982). Gleichzeitig konnte ein Transfer von CD4+ Zellen aus kranken Tieren in T-Zell-defiziente Ratten den Ausbruch der Autoimmunerkrankung vermitteln (Penhale et al. 1976; Sakaguchi, Takahashi, and Nishizuka 1982). Offenbar existierten also zwei gegensätzliche Arten von CD4+ Zellen in der Peripherie, von denen der eine Typ Autoimmunphänomene vermitteln und der andere diese unterdrücken konnte.

Der Durchbruch schließlich gelang 1995, als Sakaguchi et al. mit CD25, der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette, einen geeigneten Marker fanden, durch welchen eine suppressive Subpopulation von ca. 5 – 10 % der CD4+ Zellen charakterisiert werden konnte. Ein Transfer von CD25-depletierten CD4+ T-Zellen aus BALB/c nu/+ in BALB/c Mäuse ohne Thymus führte hierbei zu autoimmun-vermittelten Entzündungen zahlreicher Organe und zusätzlich zu einer übersteigerten Immunantwort gegen Fremd-Antigene (Sakaguchi et al. 1995). Gleichzeitig konnte ein Transfer von CD4+CD25+ Zellen in athymische Mäuse (nach neonataler Thymektomie) den Ausbruch einer Autoimmunkrankheit verhindern (Asano et al. 1996). Diese neuen Subtypen von CD4+ Zellen wurde regulatorische T-Zellen

oder kurz Tregs genannt – und nachgerade zeigte sich, dass mit CD25 nicht nur ein geeigneter Marker, sondern gleichzeitig eine charakteristische Eigenschaft dieser neuen Zellen aufgedeckt wurde, zumal IL-2 für deren Überleben und Wachstum essentiell schien und der IL-2 Rezeptor somit ein unentbehrliches Molekül darstellte (Sakaguchi, Wing, and Miyara 2007).

Nachdem diese Entdeckung in den Folgejahren immer mehr Unterstützer gefunden hatte, konnte 2001 schließlich auch die Existenz humaner Tregs gezeigt werden. Mit Identifizierung des bei Untersuchungen der Scurfy-Maus (siehe 1.2.2.1. Foxp3) entdeckten Transkriptionsfaktors Foxp3 als Schlüsselmolekül der Entwicklung, Differenzierung und Funktion von Tregs, konnte dieser neuen Zellpopulation 2003 schließlich ein eigener, charakteristischer Phänotyp zugeschrieben werden (Miyara et al. 2011).

Im Folgenden soll dieser Phänotyp näher betrachtet und Funktion wie Bedeutung der regulatorischen T-Zellen nach dem derzeitigen Kenntnisstand erläutert werden.

## 1.2.2. Phänotypische Charakterisierung, Funktion und Bedeutung von Tregs

### 1.2.2.1. nTregs – Fakten und Einordnung

Sowie es neben der zellvermittelten Immunsuppression weitere Mechanismen der Immunhomöostase gibt, existieren auch verschiedene Zelltypen mit der Fähigkeit zur Suppression ungerichteter Immunantworten – selbst unterschiedliche Tregs wurden inzwischen charakterisiert (siehe 1.2.2.2.). Doch werden heute die sogenannten nTregs (*natural T regulatory cells*) in ihrer Bedeutung für den Erhalt der peripheren Toleranz als am wichtigsten erachtet (Shevach 2006).

nTregs stellen in der Maus ca. 5 – 10 % der CD4+ T-Zellen und werden als separate Population im Thymus gebildet. Ihre suppressive Funktion besitzen sie bereits vor Antigen-Kontakt in der Peripherie, wodurch sie sich grundsätzlich von anderen T-Zellen unterscheiden. Ihr TCR-Repertoire ist ähnlich umfassend wie das naiver T-Zellen, wobei eine vermehrte Aktivität gegenüber Selbst-Antigenen zu erwähnen ist, welche in einer höheren Affinität der TCRs zu MHC II/ Selbst-Antigenen begründet liegt. So lösen im Vergleich bereits 10 – 100fach niedrigere Konzentrationen eines Peptids suppressive Mechanismen aus (Jordan et al. 2001; Hsieh et al. 2006; Sakaguchi et al. 2003; Thornton and Shevach 2000). Die stärkere Expression akzessorischer Moleküle wie LFA-1 (*lymphocyte function associated 1*) oder ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) zeigt den bereits durch Antigen-priming im Thymus aktivierten Zustand der nTregs (Itoh et al. 1999). Während nTregs *in vitro* kaum auf TCR-Aktivierung reagieren, stellen *in vivo* Antigenstimuli über TCRs ein stark proliferatives Signal dar (Sakaguchi 2004; Maloy and Powrie 2001). Solch eine im Gegensatz zu anderen T-Zellen höhere Bereitschaft zur Proliferation, auch im gesunden Organismus, lässt eine permanente Erkennung von Selbst-Antigenen und kommensalischer Mikrobiota erahnen, wie Untersuchungen mit murinen Tregs zeigen konnten (Fisson et al. 2003).



Die Suche nach geeigneten Markern stellte schon bei Entdeckung der Tregs ein Problem dar und auch heute, Jahre nach Sakaguchis Pionierarbeit, scheint eine exakte Markercharakterisierung der Schlüssel zu genauerem Verständnis und therapeutischer Anwendung dieser Subpopulation.

#### *CD25*

Neben CD4 als Gruppenmerkmal und Foxp3 als dem einzig spezifischem, jedoch wenig praktikablem (siehe unten) Charakteristikum, ist CD25 immer noch der beste Oberflächenmarker um die suppressiven Zellen zu identifizieren (Mottet and Golshayan 2007). Allerdings ist CD25 nicht spezifisch für regulatorische T-Zellen, da es bei T-Zell-Aktivierung im Allgemeinen hochreguliert wird. Dies stellt insbesondere bei der Arbeit mit humanen Zellen ein nicht unwesentliches Problem dar: In der Maus besteht eine sehr gute Korrelation zwischen CD25 und Foxp3 – und nur ca. 10% aller Foxp3+ Zellen sind für CD25 negativ und umgekehrt. Humane Tregs in hoher Konzentration finden sich hingegen nur unter den CD4+ CD25<sup>high</sup> Zellen, welche ca. 2% aller CD4+ ausmachen. Die Foxp3 Expression innerhalb der CD4+ CD25<sup>int</sup> fällt sehr variabel aus. Jedoch sind hier im Gegensatz zur Maus alle CD25- Zellen auch Foxp3- (Shevach 2006).

#### *Foxp3*

Foxp3, aus der Familie der *forkhead-winged helix* Transkriptionsfaktoren ist der bisher einzige spezifische Marker für regulatorische T-Zellen. Jedoch ist er für die Zellisolierung wenig praktikabel, da für eine Antikörperfärbung des intranukleären Transkriptionsfaktors die Permeation der Zellen nötig wird. Identifiziert wurde Foxp3 ursprünglich als verantwortlicher X-chromosomaler Mutationsloкус in Scurfy-Mäusen, welche auf Grund dieses Gendefekts eine schwere und bereits wenige Wochen nach Geburt tödlich endende Autoimmunerkrankung entwickelten. Vergleiche mit dem analogen Krankheitsbild im Menschen (IPEX, siehe 1.2.2.4. *human*) führten zu der Erkenntnis, dass bei vorliegendem Gendefekt keine funktionellen Tregs mehr gebildet werden können. Die transgene Einbringung des Foxp3 wildtyp-Allels konnte den Ausbruch der Krankheit verhindern. Physiologisch wird Foxp3 im Thymus von  $\alpha\beta$  TCR-tragenden Zellen mit hoher Affinität zu Selbst-Antigenen exprimiert (Jordan et al. 2001). Allein im naiven Zustand werden etwa 300 Gene durch die direkte Bindung von Foxp3 moduliert (Zheng et al. 2007). Foxp3 vermittelt die Differenzierung zu Tregs, ihr Überleben sowie ihre suppressive Funktion. Parallel zu einem grundsätzlich eher antiproliferativen Effekt, bewahrt Foxp3 differenzierende Tregs aber auch vor einem Ruhestadium (Lin et al. 2007) – es erhält sogar ihr hohes Proliferationspotential. Schließlich gewährleistet Foxp3 ein hohes Expressionsniveau von CD25 und damit die überlebenswichtige IL-2 Versorgung der Tregs (Setoguchi 2005). Zusammengefasst erhält eine Treg Zelle also erst durch die Expression von Foxp3 ihre wesentlichen Merkmale: nämlich die Unfähigkeit IL-2 und Th1/Th2-typische Zytokine zu produzieren, das hohe Expressionsniveau von CD25 bei niedriger IL-7 Rezeptor Expression sowie ihre Abhängigkeit von IL-2.

Tatsächlich wird Foxp3 nur in Tregs permanent exprimiert und gilt somit als spezifisch für die Suppressionsfähigkeit der Zellen. Gleichwohl kennt man TCR-vermittelte Induktion von Foxp3 in

nicht-suppressiven Zellen – allerdings nur beim Menschen, nicht aber in der Maus. Diese induzierte Foxp3 Expression in aktivierten T-Zellen ist transient, im Vergleich geringer ausgeprägt und im Verhalten ähnlich der von CD25 (Gavin et al. 2006).

Die Tatsache, dass der bisher einzige spezifische Treg-Marker gerade beim Menschen die Unterscheidung von aktivierten Effektor-T-Zellen (Teff) schwierig macht, stellt vor allem für die Isolierung und therapeutische Anwendung von Tregs ein großes Problem dar. Eine Möglichkeit diesem Problem zu begegnen, besteht in der genaueren Unterscheidung humaner Treg Subtypen.

#### *CD45RA/RO*

Im Gegensatz zu murinen Zellen können hier mindestens zwei Gruppen Foxp3 Tregs mittels CD45 unterschieden werden: naive, wirkliche nTregs sind CD45RA+, aktivierte oder *memory* Tregs CD45RA- bzw. CD45RO+ (Miyara et al. 2011). Letztere weisen eine höhere Foxp3 und CD25 Expression auf. So ergeben Tregs, welche über den Marker CD45RA+ aufgereinigt werden nach *in vitro* Expansion eine nahezu homogene, suppressive Treg Population (Valmori et al. 2005; Hoffmann et al. 2006).

#### *CD127*

Ein weiterer zunächst vielversprechender Marker für eine erfolgreiche Isolierung und mögliche therapeutische Anwendung humaner Tregs scheint CD127, der IL-7 Rezeptor. Regulatorische T-Zellen des Menschen zeigen eine niedrige Expression dieses Rezeptors. Allerdings verhält es sich mit ihm ähnlich, wie mit CD25. Im Falle einer Aktivierung wird er in T-Zellen allgemein früh herunterreguliert (Shevach 2006). CD127<sup>low</sup> ist im inflammatorischen Milieu somit unspezifisch.

#### *CTLA-4, GITR*

Ähnlich wie mit CD25, Foxp3 und CD127 verhält es sich mit CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*). Dieses für die suppressiven Eigenschaften von Tregs vermutlich essentielle (siehe 1.2.2.3.) Molekül wird in murinen regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert und gilt hier als spezifisches Merkmal. Für eine Identifizierung humaner Tregs ist es jedoch kaum zu verwenden, da im Menschen CTLA-4 wie auch GITR (*glucocorticoid-induced tumour necrosis factor*) –auch bei der Aktivierung naiver T-Zellen hochreguliert werden.

#### *CD103*

Ein Oberflächenmarker, welcher nur eine Subgruppe von Tregs mit Vorkommen in intestinalen, bronchialen und glandulären Epithelien charakterisiert, ist CD103, ein Integrin, welches durch Catherin-Interaktion für die gewebsspezifische Adhäsion der Tregs verantwortlich ist (Lehmann et al. 2002). Während dieser Marker in 10-30% der murinen peripheren Tregs exprimiert wird, sind weniger als 5% der humanen CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> Zellen positiv für CD103. Ob es sich hierbei nur um Hochregulation im inflammatorischen Milieu handelt, konnte noch nicht sicher gezeigt werden (X. Chen and Oppenheim 2011).

### *Chemokin Rezeptoren*

Als weitere *homing* Faktoren, welche Tregs an den Ort der Entzündung bringen, werden u.a. die Chemokin Rezeptoren CCR4, CCR5 und CCR8 exprimiert. Durch CCL17 und CCL22 – von Dendritischen Zellen (DC) produziert – werden Tregs in die sekundären lymphatischen Organe geleitet (Tellem et al. 2001).

Zusammenfassend wird klar, dass eine exakte Identifizierung und hochreine Isolierung von Tregs nach spezifischen Charakteristika mit den heute bekannten Oberflächenmarkern, zumindest im Menschen, nicht ohne weiteres möglich ist. Zudem sollten die zahlreichen Unterschiede zwischen murinen und humanen Zellen, zwischen Ruhezustand und Inflammation sowie den diversen heute bekannten Subtypen regulatorischer T-Zellen untereinander (siehe unten) bei der Interpretation der teils widersprüchlichen Ergebnisse zu Funktionsmechanismen und Therapieergebnissen der Tregs unbedingt berücksichtigt werden.

#### 1.2.2.2. Weitere Suppressoren

Heute, 17 Jahre nach Entdeckung der Tregs kennt man bereits eine ganze Reihe an T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften, deren tatsächliche *in vivo* Bedeutung im Einzelnen noch ungeklärt ist.

#### *iTregs*

Das Gegenstück zu den bisher vornehmlich behandelten, im Thymus gebildeten nTregs bilden sogenannte adaptive oder induzierte Tregs (iTregs), welche im peripheren lymphatischen Gewebe aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> Zellen durch Induktion von Foxp3 entstehen. Für diese Konversion sind in der Hauptsache zwei Faktoren verantwortlich: die Anwesenheit von TGFβ und die Art der Antigenpräsentation. So konnte in Experimenten mit murinen wie humanen Zellen gezeigt werden, dass durch TGFβ im Beisein von IL-10 oder mittels TCR-Aktivierung aus naiven CD4<sup>+</sup> Zellen in 50 – 100 % Foxp3<sup>+</sup> Tregs entstehen (W. Chen et al. 2003; Fantini et al. 2004). Während jedoch so entstandene murine iTregs *in vitro* wie *in vivo* Suppressorfunktion besitzen, konnten bei humanen iTregs *in vivo* noch keine suppressiven Eigenschaften nachgewiesen werden (Shevach 2006). Die kontinuierliche Präsentation von Antigenen in niedriger Dosis und ohne Aktivierung von DCs führt ebenfalls zu einer verstärkten Bildung von iTregs (Apostolou and Boehmer 2004). Interessant ist auch die Beobachtung, dass trotz einer potentiell permanenten Bildung von iTregs die Gesamtzahl an Tregs im Körper immer konstant bleibt. Möglicherweise wird der Effekt von TGFβ aber auch von IL-6 kompensiert, welches eher die Th17 Differenzierung stimuliert (Bettelli et al. 2006). Die physiologische Relevanz und das tatsächlich Verhältnis zwischen nTregs und iTregs im Körper, sowie die Stabilität einer induzierten Suppressorfunktion und der davon abhängige therapeutische Nutzen dieser Zellen bleiben also bis heute unbekannt.

#### *Th3 und Tr1*

Zwei bereits vor den eigentlichen Tregs entdeckte T-Zelltypen mit suppressiven Eigenschaften sind Th3 und Tr1 Zellen. Erstere konnten in Mäusen beobachtet werden, die mit oraler Applikation niedrig

dosierter Antigene behandelt wurden. Ein Charakteristikum von Th3 Zellen ist die Produktion von TGF $\beta$ . Letztgenannte konnten *in vitro* und im Beisein von IL-10 aus murinen und humanen CD4+ Zellen generiert werden. Sie sind antigenspezifisch und produzieren große Mengen IL-10. Solche Tr1 Zellen exprimieren jedoch kein Foxp3. Ihre physiologische Bedeutung konnte für einige virale und bakterielle Infektionen, insbesondere chronischer Art gezeigt werden. So induziert zum Beispiel ein *Bordetella pertussis* Antigen die Produktion von IL-10, welches die IL-12 Produktion durch DCs und Makrophagen inhibiert (Mills 2004).

#### *CD8+ Suppressorzellen*

Neben CD4+ Tregs im engeren Sinne, gibt es eine ganze Reihe von Beobachtungen an CD8+ T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften. So gibt es Populationen von CD8+ Tregs, die Antigene von Zelloberflächen zusammen mit MHC I erkennen und CD4+ Zellen hemmen können (Jiang and Chess 2000). Andere erkennen Immunglobulindeterminanten, produzieren TGF $\beta$  und hemmen die IFN $\gamma$  Produktion von CD4+ und CD8+ Zellen (Hahn et al. 2005). Wieder andere ähneln Tr1 Zellen, produzieren IL-10 und spielen eine Rolle in der Tumorimmunologie, wo sie gegen den Tumor gerichtete CD4+ Zellen hemmen. 50% dieser CD8 Tregs sind zusätzlich CD122+ und können sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen inhibieren (Rifa'i et al. 2004). Des Weiteren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei wiederholter Stimulation humaner T-Zellen mit Hilfe gepulster APCs CD8+ CD28- Tregs entstehen welche Foxp3 exprimieren und APCs hemmen (Vlad, Cortesini, and Suci-Foca 2005). Schließlich scheint unter humanen CD8+ Zellen auch das tatsächliche Pendant zu nTregs zu existieren: CD8+ CD25+ Tregs mit CTLA-4 Expression, bisher allerdings ohne einen Nachweis von Foxp3 (Cosmi et al. 2003). Zusätzlich gibt es auch noch CD4- CD8- doppelnegative Tregs (DN), die in der Maus 1 – 3%, im Menschen ca. 0,8% aller T-Zellen ausmachen und CD4+ und CD8+ Zellen derselben TCR-Spezifität zumindest *in vitro* inhibieren und auch zerstören können (Shevach 2006; Fischer et al. 2005).

Zusammenfassend muss trotz dieser Vielfalt an CD8+ und DN Tregs, wie auch bei allen zuvor beschriebenen Suppressorzellen, eingeräumt werden, dass ihr Platz im Organismus und ihre Bedeutung für das Immunsystem unklar bleiben und sie bei der Suche nach therapeutischen Anwendungen aktuell noch keine zentrale Rolle spielen. Aus diesem Grund beziehen sich die weiteren Kapitel erneut im Wesentlichen auf nTregs.

#### 1.2.2.3. Mechanismen der Suppression

Trotz intensiver Suche gibt es bis heute keine exakte Antwort auf die Frage, wie Tregs unser Immunsystem regulieren und inadäquate Immunantworten unterdrücken. Demgegenüber steht eine Reihe verschiedener meist *in vitro* beobachteten Mechanismen Zell-Zell-Kontakt abhängiger oder unabhängiger Suppression verschiedener Zelltypen durch Tregs, deren Konzepte mit den dahinter stehenden Daten teils schwer zu vereinigende Aussagen liefern. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind zum einen schlicht mit ihrem Alter zu erklären, da in den letzten Jahren insbesondere im Bereich der

Markercharakterisierung von Tregs wichtige Erkenntnisse hinzugewonnen wurden (siehe 1.2.2.1) und rückbezüglich nicht immer nachzuvollziehen ist, ob es sich bei einzelnen mechanistischen Beobachtungen nun um die Funktion von nTregs, iTregs oder aktivierten Effektor-T-Zellen handelte. Zum anderen wurden *in vitro* Daten mit unterschiedlichen Assays generiert, Tregs mit verschiedenen Marker-Kombinationen und unterschiedlichen Techniken isoliert und Zellkulturen in unterschiedlichem Maße auf Verunreinigung überprüft (Anteil an Foxp3+ Zellen im Experiment). Hinzu kommen verschiedene Krankheitsmodelle, Zielorgane und Mauslinien (Mottet and Golshayan 2007). Am Ende bleibt weiterhin unklar inwiefern Schlussfolgerungen aus *in vitro* Studien auf die physiologischen Vorgänge der Immunsuppression *in vivo* übertragen werden können (Shevach 2009).

*In vivo* haben im Allgemeinen und nach heutiger Sicht Moleküle wie CTLA-4, GITR, Galectin, c-AMP, TGF $\beta$ , IL-10 und Granzyme entscheidenden Anteil an der Funktion von Tregs, die damit eine Reihe verschiedener Zelltypen inhibieren bzw. zerstören können. So bilden andere T-Zellen, B-Zellen, DCs, Makrophagen, Osteoblasten, Mastzellen, NK- und NKT-Zellen Ziele von regulatorischen T-Zellen (Shevach 2009).

*In vitro* wiederum kann man hauptsächlich zwischen Inhibitionswegen gegen T-Zellen und solchen gegen DCs unterscheiden. Mit T-Zellen als Ziel der Suppressionsanalysen, ergaben sich folgende Inhibitionsmechanismen:

#### *IL-2*

Über längere Zeit wurde angenommen, dass IL-2 eine entscheidende Rolle für die suppressive Funktion von Tregs spielen müsse, da diese mit CD25, CD122 und CD132 alle Bestandteile des hochaffinen IL-2 Rezeptors exprimieren und IL-2 selbst essentiell für ihr Überleben ist. So schien die Vorstellung naheliegend, dass Tregs mit anderen T-Zellen um verfügbares IL-2 kompetitieren und letztere durch IL-2 Verbrauch an der Proliferation hindern würden (Pandiyana et al. 2007). Neuere Befunde widersprechen dieser Annahme jedoch (Tran et al. 2009), so dass man davon ausgehen muss, dass die Rolle von IL-2 für die Suppression überschätzt wurde.

#### *IL-35*

IL-35 ist ein inhibitorisches Zytokin aus der IL-12-Familie. In murinen Tregs, die Teff Zellen supprimierten, wurde eine erhöhte Produktion von IL-35 nachgewiesen und umgekehrt waren Tregs von IL-35 defizienten Mäusen nicht funktionell (Collison et al. 2007). Bisher konnte dieses Zytokin in humanen Tregs jedoch nicht gezeigt werden (Bardel et al. 2008).

#### *Galectin-1/Galectin-10*

Galectin-1, aus der Familie der  $\beta$ -Galactosid-bindenden Proteine bindet an verschiedene Oberflächenproteine von T-Zellen, hemmt deren Produktion proinflammatorischer Zytokine und führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose (Garín et al. 2007). Unklar ist jedoch ob Galectin hierzu als gelöster Faktor von Tregs sezerniert wird oder ob ein Zell-Zell-Kontakt nötig ist. Das Pendant hierzu im Menschen ist Galectin-10, welches allein von humanen Tregs exprimiert wird. Allerdings muss sich der

bisher ungeklärte Mechanismus vom murinen unterscheiden, da Galectin-10 ausschließlich intrazellulär gefunden wurde (Kubach et al. 2007).

#### *Granzyme A/B*

Neben bisher genannten Mechanismen mit Hilfe gelöster oder membranständiger suppressiver Proteine gibt es auch die Beobachtung direkter Zytotoxizität durch Tregs. So konnte Granzym A Expression bei humanen Tregs gefunden werden, die damit aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen Perforin-abhängig lysierten (Grossman et al. 2004). Ebenso zeigten murine Tregs Zytotoxizität mittels Granzym B (Gondek et al. 2005). Allerdings scheint sich dieser Mechanismus nur gegen T-Zellen zu richten. Ein zytolytisches Vorgehen gegen DCs oder B-Zellen wurde noch nicht beobachtet (Cosmi et al. 2003).

Anstatt Teff Zellen direkt zu inhibieren, erscheint es nur effektiv noch früher in der Immunaktivierung einzugreifen. So besteht auch ein Hauptmechanismus der Tregs-Funktion darin, Antigen-präsentierende Zellen zu regulieren und so der Aktivierung und Differenzierung von Teff Zellen zuvorzukommen.

#### *CTLA-4*

Eine Strategie von Tregs APCs zu inhibieren, betrifft CTLA-4, welches alleine in Tregs konstitutiv exprimiert wird. So konnte gezeigt werden, dass Tregs über CTLA-4 die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in DCs herunterregulieren können und den Antigen-präsentierenden Zellen damit die Möglichkeit nehmen naive T-Zellen zu stimulieren (Misra et al. 2004). Als möglicher molekularer Mechanismus hierfür wird ein Prozess namens Trogozytose angenommen, bei dem Oberflächenmoleküle über die immunologische Synapse von APCs auf die T-Zellen übertragen werden (Joly and Hudrisier 2003). Durch die Interaktion von CTLA-4 mit CD80/86 wird in den DCs außerdem Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) exprimiert, welche wiederum proapoptische Metabolite produziert und hierdurch möglicherweise die T-Zell-Aktivierung inhibiert (Grohmann et al. 2002). Ob dieser Mechanismus allerdings *in vivo* eine Bedeutung hat ist nicht geklärt.

#### *LAG-3*

LAG-3 (CD233) ist ein CD4 Homolog welches mit hoher Affinität an MHC II bindet, inhibitorische Signale induziert und hierüber die Reifung und Funktion der DCs supprimieren kann (Liang et al. 2008).

#### *CD39, CD73 (AMP und Adenosin)*

Extrazellulär vorliegendes ATP ist immer ein Anzeichen von Gewebsschäden und somit ein Alarmsignal für unser Immunsystem. CD39 ist hierbei ein Ektoenzym und für die Hydrolyse von ATP und ADP in AMP zuständig. Unter anderem wird es in allen murinen und 50% der humanen Tregs exprimiert – jedoch nur in aktivierten Tregs (Borsellino et al. 2007). Durch die Reduktion von ATP im Milieu wird so vermutlich einerseits die Reifung von DCs inhibiert, andererseits der Eintritt regulatorischer T-Zellen in entzündetes Gewebe erleichtert und die ATP getriebene Produktion proinflammatorischer Prozesse

gebremst (Shevach 2009). Verstärkt wird der Effekt dieser verringerten ATP-Konzentration noch zusätzlich durch den endgültigen Abbau von AMP zu Adenosin mit Hilfe von CD73. Das anfallende Adenosin wiederum supprimiert nämlich zusätzlich die Funktion von DCs und aktivierten T-Zellen (Deaglio et al. 2007).

#### *FGL2*

Ein weiteres Molekül, durch welches Tregs die aktivierende Funktion von DCs unterbinden können ist FGL2, *fibrinogen like protein 2*. Es wird in Tregs verstärkt exprimiert und führt ebenfalls zu einer verringerten Expression von CD80/86 in DCs, wie *in vivo* gezeigt werden konnte (Shalev et al. 2008).

#### *Nrp-1*

Ein weiterer Mechanismus um den Einfluss von Tregs auf APCs zu verstärken, besteht in der Verlängerung der Interaktionsdauer. Dies wird möglicherweise durch Nrp-1 (Neuropilin) vermittelt, einen Rezeptor der Klasse III Semaphorins und Korezeptor von VEGF. So konnte gezeigt werden, dass Nrp-1, welches von Tregs verstärkt exprimiert wird, lange Interaktion zu DCs fördert, während die Blockade desselben die Anzahl dieser Interaktionen verringerte und den suppressiven Effekt aufhob (Sarris et al. 2008). Hierdurch könnten sich Tregs bezüglich der Bindung von Antigenen einen Vorsprung gegenüber T-eff Zellen verschaffen (Shevach 2009).

#### *TGF $\beta$ , IL-10*

Sowohl TGF $\beta$  als auch IL-10 wurden lange Zeit als wichtige Faktoren regulatorischer T-Zellen angesehen – so ist bekannt, dass TGF $\beta$  eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Foxp3 spielt (siehe 1.2.2.2. *iTregs*). Ihre Bedeutung für den Mechanismus der Immunsuppression wurde jedoch vor allem in anderen inhibitorischen Zelltypen, wie Th3 und Tr1 Zellen erkannt (siehe 1.2.2.2. *Th3 und Tr1*). Zwar konnte eine erhöhte Expression von TGF $\beta$  in humanen Tregs nachgewiesen werden, eine funktionelle Bedeutung für ihre suppressive Kapazität ist jedoch fraglich. Denn obschon ein siRNA *knock down* von TGF $\beta$  *in vitro* leichte Einbußen in der Funktion dieser Tregs zur Folge hatte, scheint die Produktion dieses Faktors *in vivo* keinen maßgeblichen Einfluss auf suppressive Mechanismen zu besitzen (Shevach 2009; Mamura et al. 2004). Einzig in Verbindung mit IL-10 produzierenden Tregs scheint TGF $\beta$  einen direkten Anteil an der Suppression zu haben.

IL-10 wiederum wird von zahlreichen Zelltypen (T-Zellen, Makrophagen, Epithelzellen...) produziert. Seine Bedeutung als potenter Inhibitor der Zellproliferation, der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und der DC-Reifung (Moore et al. 2001) jedoch konnte, für die Funktion von Tregs, bisher nur auf lokaler Ebene nachgewiesen werden – insbesondere bei Tregs in Epithelien des Magen-Darm-Traktes (Mottet, Uhlig, and Powrie 2003). Im Zusammenhang mit diesen IL-10 produzierenden Tregs scheinen TGF $\beta$  und IL-10 in einer synergistischen Art und Weise, wahrscheinlich über positive *feed back* Schleifen, zusammenzuwirken. Hierbei bleibt IL-10 eher lokal auf den Ort der Entzündung beschränkt, während TGF $\beta$  systemischen Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen scheint (Mottet and Golshayan 2007).

Neben der Vielzahl an *in vitro* beobachteten Suppressionsmechanismen von Tregs scheint der Einfluss auf APCs eine besondere, nicht auf die direkte Inhibition dieser Zellen beschränkte Stellung einzunehmen, da er die Frage beantwortet, warum Antigen-spezifische Tregs auch Antigen-unspezifisch supprimieren können. So wird durch CD80/86 Modifizierung, Zytokin-vermittelte Inhibition von DCs, Adenosin oder die längere Kontaktzeit einer Antigen-spezifischen regulatorischen T-Zellen nicht alleine eine einzelne APC unterdrückt. Diese wird auch daran gehindert weitere T-Zellen ganz verschiedener Antigen-Spezifität zu aktivieren, die mit ihr in Kontakt treten (Onishi et al. 2008). Dies wiederum ist möglicherweise ein bedeutsamer Hinweis auf die Frage, ob eine Autoimmunerkrankung, in welcher viele Selbst-Antigene involviert sind, auch mit ebenso vielen spezifischen Tregs behandelt werden muss oder ob eine unspezifischen Immunsuppression nicht ausreichend wäre (Miyara, Wing, and Sakaguchi 2009).

Obschon alle *in vitro* Beobachtungen zusammengenommen ein relativ komplexes Bild der suppressiven Funktion von Tregs zeichnen, ist die Situation *in vivo* ungleich unübersichtlicher. So haben Treg Zellen im Organismus zum einen viel mehr Platz der Suppression durch Tregs auszuweichen, zum anderen ist es immer noch unklar, wie Tregs *in vivo* aktiviert werden und wo sie ihre Funktion ausüben – ob in sekundären lymphatischen Organen, im entzündeten Gewebe oder an beiden Orten. Hinzu kommt, dass viele *in vivo* Studien mit Zelltransfers in immundefiziente Mäuse durchgeführt wurden, was die Proliferation von Tregs und Treg Zellen, vermutlich anders als in gesunden Tieren, stimuliert (Shevach 2009). So ist ungewiss, ob sich bei Immunsuppression *in vivo* überhaupt diejenigen Mechanismen abspielen, die nach *in vitro* Untersuchungen angenommen wurden.

Bereits die Frage nach dem Aktivierungsweg der Tregs scheint widersprüchlich. Während Tregs *in vitro* nicht auf TCR-Stimuli reagieren, zeigen sie *in vivo* expansives Verhalten auf TCR vermittelten Antigen-Kontakt (Walker et al. 2003). Vermutlich werden Tregs im Organismus permanent mit MHC II gebundenen Selbst-Antigenen konfrontiert und es bedarf zusätzlicher Signale – vielleicht IL2 von Treg Zellen – um sie vollständig zu aktivieren (Shevach 2009). Welcher der vielen *in vitro* Mechanismen im Organismus wohl die Hauptrolle spielt, ist bisher ebenfalls nicht eindeutig zu beantworten. So zeigten Versuche mit EAE (*experimental autoimmune encephalitis*) eher eine Hemmung der Migration von Treg Zellen, die vermehrt in Lymphknoten statt dem Zielorgan gefunden wurden, während die Produktion proinflammatorischer Zytokine nicht beeinträchtigt schien (Shevach 2009). In Diabetes-Modellen hingegen konnte eine reduzierte IFN $\gamma$  Produktion nachgewiesen werden (DiPaolo et al. 2007). In Gastritis-Mäusen schließlich fiel die inhibierte Differenzierung autoreaktiver T-Zellen zu Th1 Zellen auf (Sarween et al. 2004). Bei Entzündungen des Magen-Darm-Traktes wurden hier vermehrt IL-10 produzierende Tregs in der *Lamina propria* gefunden.



Eine direkte Suppression von Teff Zellen wurde in nur wenigen Studien beobachtet und insbesondere CD8+ T-Zellen scheinen in ihrer Expansion oder Differenzierung kaum beeinträchtigt zu werden, sondern nur in ihrem zytotoxischen Potential (M.-L. Chen et al. 2005). So konnte gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von Tregs die Freisetzung lytischer Granula in CD8+ Zellen supprimiert wurde (Mempel et al. 2006). Statt eines solchen direkten Einflusses auf T-Zellen scheint aber ein anderer Mechanismus *in vivo* vorherrschend zu sein.

So weisen Daten darauf hin, dass DCs, die Kontakt zu Tregs hatten eine reduzierte Fähigkeit zur Präsentation von Selbst-Antigenen zeigen (DiPaolo et al. 2005). Ebenso nimmt hier die Rate an Interaktionen von DCs mit Teff Zellen ab und diejenigen T-Zellen, welche doch mit DCs in Kontakt treten, gehen darauf in Zellzyklusarrest (Tadokoro 2006; Tang et al. 2006). Es scheint also, wie bereits bei der Erläuterung der *in vitro* Mechanismen vermutet, dass Tregs *in vivo* vor allem die Fähigkeit von APCs, autoreaktive Teff Zellen zu stimulieren beeinträchtigen und somit eine Autoimmunantwort stoppen noch ehe sie entsteht. Dennoch steht diesem Weg noch immer eine Vielzahl von Suppressionsmechanismen an mehreren Punkten der Immunantwort gegenüber, die vermutlich in verschiedenen Krankheiten unterschiedliche Bedeutung haben. Und gleichzeitig bleiben weitere Fragen offen: Ist ein Zell-Zell-Kontakt wirklich nötig ist – eine Vermutung die nur auf Grund eines Experimentes Bedeutung erlangte (Shevach 2009) – und in wie weit sind *in vitro* und *in vivo* Daten, die verschiedentlich angewandten Krankheitsmodelle und unterschiedlichen Mausstämme tatsächlich mit der physiologischen Wirklichkeit der Treg-Funktionen vergleichbar?

#### 1.2.2.4. Bedeutung von Tregs in Mausmodellen und Autoimmunerkrankungen des Menschen

Alle bisher genannten Eigenschaften von Tregs machen deutlich, dass diese Zellen permanent die Aktivierung und Ausbreitung autoreaktiver T-Zellen im Organismus unterdrücken. Ein genetischer Defekt, eine Funktionsstörung oder eine mengenmäßige Veränderung der Tregs führen zu pathologischer Autoimmunität, wofür sich in der Maus, wie auch im Menschen zahlreiche Beispiele finden.

##### *murin*

Bereits Ende der 60er Jahre wurde beobachtet, dass eine Thymektomie bei Mäusen unmittelbar (3 Tage) nach ihrer Geburt zu autoimmun-vermittelten Entzündungsvorgängen, zuerst an den Ovarien, später an weiteren Organen führt (siehe 1.2.1). Heute weiß man, dass eine solche neonatale Thymektomie bei einigen Mausstämmen zu einem Krankheitsbild, ähnlich der APS II (*autoimmune polyglandular syndrome type II / Schmidt's syndrome*), einer Immunreaktion gegen mehrere, insbesondere endokrine Organe, führt und neben der damals beschriebenen „*ovarian dysgenesis*“ auch Gastritis, Thyreoiditis, Orchitis, Prostatitis und Sialadenitis einschließt. Hieraus isolierte Tregs zeigen *in vitro* eine reduzierte Funktion (Sakaguchi et al. 1985; Kriegel et al. 2004). Ein anderes Beispiel sind CTLA-4 KO (*knock out*) Mäuse, deren Tregs kein CTLA-4 exprimieren, während andere T-Zellen dies jedoch nach Aktivierung in der

Lage sind. Diese Mäuse entwickeln eine tödlich verlaufende lymphoproliferative Erkrankung, die sich vor allem durch Myocarditis, interstitielle Pneumonitis, Gastritis, Sialadenitis und Hyper-IgE manifestiert (Tivol et al. 1995). Die Scurfy-Maus schließlich ist das Modell, welches wohl am eindrucklichsten den direkten Zusammenhang eines ursächlichen Treg-Defekts und der daraus folgenden Autoimmunerkrankung aufzeigt. Auf Grund eines genetischen Fehlers im Foxp3 Gen kommt es zum Verlust der Foxp3 Expression und in der Folge zu einer rasch progredienten systemischen Entzündung, einschließlich Diabetes mellitus Typ 1, Enteropathie, Thrombozytopenie, Autoimmunhämolytischer Anämie und Hypogonadismus, die innerhalb des ersten Lebensmonats zum Tod der Mäuse führt (Brunkow et al. 2001). Das Pendant hierzu findet sich beim Menschen unter dem Begriff IPEX.

#### *human*

IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy, X linked syndrome*) entwickelt sich meist im ersten Jahr nach Geburt, in manchen Fällen jedoch bereits im Uterus und manifestiert sich durch eine Enteropathie mit schwerem *wasting* Syndrom, Diabetes mellitus Typ 1, Autoimmunthyreoiditis, exfoliative Dermatitis, Nephritis, Hepatitis, Trombo- und Neutrophenie, Autoimmunhämolytischer Anämie u.a. IPEX Patienten zeigen in der Regel keinerlei Foxp3 Expression – wenige Fälle mit reduziertem oder gar normalem Foxp3 Level bilden eher die Ausnahme (Wildin et al. 2001; Gambineri et al. 2008). Aufgrund dieser Parallele zwischen Mausmodell und klinisch relevanter Humanpathologie wurde auch bei anderen potentiell autoimmun-vermittelten Erkrankungen des Menschen, vornehmlich aus dem rheumatischen Formenkreis, intensiv nach eventuellen Defekten in Funktion und Anzahl von Tregs gesucht.

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist die Datenlage zur Rolle der Tregs noch sehr widersprüchlich. Während die meisten Studien bei RA-Patienten von reduzierten oder normalen Treg-Frequenzen sprechen (Sempere-Ortells et al. 2009), berichten andere von einer erhöhten Anzahl (van Amelsfort et al. 2004). Während zirkulierende Tregs eine gestörte Suppression (niedrige CTLA-4 Expression, wenig Einfluss auf Zytokinproduktion von T<sub>H</sub> Zellen) zeigen (Möttönen et al. 2005), scheinen synoviale Tregs *in vitro* normal zu funktionieren. Unklar ist, inwieweit das inflammatorische Milieu der Synovia (IL-17, IL-6, TNF $\alpha$ ) die *in vivo*-Funktion nicht dennoch beeinträchtigt (M.-F. Liu et al. 2005; van Amelsfort et al. 2007; Miyara et al. 2011).

Auch bei systemischem Lupus erythematoses (SLE) konnten niedrige Treg-Frequenzen in negativer Korrelation mit dsDNA-Antikörpern nachgewiesen werden, jedoch wurden in einigen Fällen erhöhte Frequenzen beschrieben (Miyara et al. 2011). Eine einfache Erklärung für diese widersprüchlichen Angaben wäre gegeben, wenn es sich bei vielen dieser Zellen nur um aktivierte T<sub>H</sub> Zellen handelte, welche im entzündeten Gewebe Foxp3 exprimieren (Yang et al. 2009). Hinweise hierfür gibt es (Miyara et al. 2011). Insbesondere jüngere Studien zur Funktion der Tregs in SLE-Patienten zeichnen ein interessantes Bild (Yan et al. 2008; Venigalla et al. 2008). Während die Zellen eine intrinsische Suppressionsaktivität zeigen, scheinen sie diese nicht gegen die autoreaktiven T<sub>H</sub> Zellen einsetzen zu

können. Daher wird vermutet, dass eine mögliche Erklärung für die Pathogenese der SLE weniger im Defekt der Tregs, als in einer Resistenz aktivierter Teff Zellen gegen Suppression zu suchen sei. Möglicherweise kommt eine Verringerung der Treg-Frequenz auf Grund geringer IL-2 Produktion in SLE-Patienten noch hinzu (Linker-Israeli et al. 1983).

Weitere Erkrankungen – neben Multipler Sklerose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Myasthenia gravis und diverser Allergien – vor allem aus dem Kreis der Vaskulitiden und Kollagenosen wurden ebenfalls bereits mit Tregs in Verbindung gebracht. Jedoch ist die Datenlage beispielsweise für das Sjögren-Syndrom, wie bei RA und SLE, noch sehr widersprüchlich und verschiedene Studien sprechen von erhöhten, normalen oder verringerten Treg-Frequenzen, wobei die *in vitro*-Funktion der Zellen ungestört zu sein scheint (Li et al. 2007; Sarigul et al. 2010; Gottenberg et al. 2005). Ebenso werden Fälle der Wegener Granulomatose mit verringerten oder erhöhten Treg-Zahlen beschrieben – ihre Suppressionskapazität *in vitro* ist hier jedoch gestört (M. D. Morgan et al. 2010; Rimbart et al. 2011). Therapie-Schemata mit Anti-CD20 Antikörpern konnten zumindest die Treg-Frequenzen bei diesen Patienten normalisieren (Saadoun et al. 2008). Schließlich wurden in anderen Arbeiten erhöhte Treg-Zahlen mit defekter Suppressionsaktivität bei Patienten mit systemischer Sklerose (Sklerodermie) nachgewiesen (Broen et al. 2010), obgleich jedoch auch in diesen Fällen nicht auszuschließen ist, dass es sich dabei um aktivierte Teff Zellen handelt (Miyara et al. 2011).

Aus diesen und zahlreichen weiteren Beispiele wird deutlich, dass sich viele der *in vitro* generierten, schlüssig und eindrucklich erscheinende Befunde zu Tregs nur schwer auf komplexe Krankheitsbilder wie Autoimmunerkrankungen übertragen lassen. So ist immer noch unklar, ob überhaupt eine absolute Zahl, eine Minimalfrequenz von Tregs für den Ausbruch oder Verlauf einer Autoimmunerkrankung von Bedeutung ist und ob in der Mehrheit der Fälle eher eine gestörte Funktion der Tregs, eine Resistenz der Teff Zellen oder eine Kombination aus beidem die Ursache bilden. Klare kausale Zusammenhänge und monogene Ursachen wie bei Scurfy/IPEX sind zwar die Ausnahmen, aber Beweis dafür, dass schwerwiegende Defekte in Tregs unweigerlich eine autoreaktive Aktivierung des Immunsystems zur Folge haben – auf der anderen Seite aber auch eine effektivere Tumorantwort und Infektbekämpfung bedeuten. Wie vor dem Hintergrund solcher Dysbalancen im Immunsystem Tregs bereits heute therapeutisch genutzt werden können, wird im folgenden Abschnitt beleuchtet.

### 1.3. VOM MAUSMODELL ZUM PATIENTEN – ZELLTHERAPIE MIT TREGS

#### 1.3.1. Prinzipien und Ansätze

Das denkbare Spektrum therapeutischer Ansätze mit regulatorischen T-Zellen ist breit und reicht von der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 1, Multipler Sklerose, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder rheumatoider Arthritis über die

Verhinderung von Abstoßungsreaktionen, GvHD und Allergien bis hin zu einer Stärkung der Immunabwehr durch Blockade der Treg-vermittelten Immunsuppression (Treg Depletion) für erfolgreichere Tumorantworten, bessere Infektabwehr oder als Verstärker bei Vakzinierungen. Insbesondere im ersten Fall, der Behandlung von Autoimmunerkrankungen durch Aktivierung, Expansion oder direkte Transplantation von Tregs, gilt es die Balance zwischen Teff Zellen und Tregs in Richtung der letzteren zu verschieben und dieses neue Gleichgewicht zu erhalten. Da gezeigt werden konnte, dass Tregs die Aktivierung naiver T-Zellen effektiver inhibieren können, als die Proliferation, Expansion und Aktivität bereits stimulierter Teff Zellen (Billiard et al. 2006) lässt sich schlussfolgern, dass eine Zelltherapie mit Tregs eher zur Verhinderung des Ausbruchs einer Autoimmunerkrankung bzw. zur Prophylaxe eines Rezidives oder Schubes geeignet scheint. Demnach würden sich schubweise verlaufende Krankheitsbilder wie Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis oder systemischer Lupus erythematodes als erste Therapieziele anbieten, während bei eher kontinuierlich progredienten Erkrankungen wie dem Sjögren Syndrom oder systemischer Sklerose Tregs eine adjuvante Therapie zu üblichen Immunsuppressiva darstellen könnten.

Ein wesentlich stärkerer Fokus wurde jedoch schon früh nicht auf die Therapie genannter Autoimmunpathologien, sondern auf die Behandlung alloimmunologischer Phänomene wie Transplantatabstoßungen (HvG, *host versus graft*) oder GvHD (*graft versus host disease*) gelegt. Bereits 1990, noch vor der eigentlichen Entdeckung der Tregs konnte in herztransplantierten Ratten durch Transfer von CD4+CD25+ Zellen die Annahme des Transplantats erzielt werden (Hall et al. 1990). Die 5 Jahre später durch Sakaguchi *et al.* veröffentlichten Ergebnisse, dass die neu entdeckten Tregs die Abstoßung von Hauttransplantaten bei Mäusen verhindern konnten, förderten die intensive Forschung an einem Treg-gestützten Therapieansatz auf diesem Gebiet. So erbrachten Studien in der Folge mehrfach die Erkenntnis, dass die Treg-Depletion eines Knochenmarkstransplantats vor allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Mäusen den Ausbruch einer GvHD begünstigte, während die zusätzliche Gabe von Tregs bei HSZT vor GvHD schützen konnte (Cohen et al. 2002; Hoffmann et al. 2002; Taylor, Lees, and Blazar 2002). Heute weiß man, dass auch abgesehen von GvHD das Risiko für Abstoßungsreaktionen gegen solide Organe durch eine robuste Population von Tregs verringert wird (Salama et al. 2003; Meloni et al. 2004; Muthukumar et al. 2005). Zusätzlich zu vielversprechenden Ergebnissen wie diesen birgt die Behandlung von Abstoßungsreaktionen wie der GvHD als Therapieziel auch prinzipielle Vorteile – verglichen mit Abstoßungsreaktionen nach Transplantation solider Organe. Während bei letzterer mangels Ausbildung einer zentralen Toleranz nämlich eine lebenslange Immunsuppression notwendig ist, bildet sich bei HSZT nach einer Phase systemischer Entzündung und anschließendem Austausch der wirteigenen APCs durch Donor-APCs und T-Zellen Toleranz aus. Das Zeitfenster für eine gefürchtete GvHD ist also transient und mit 1 – 3 Monaten nach Transplantation zeitlich abschätzbar. Zusammen mit dieser Aussicht auf eine lebenslange Annahme des Fremdmaterials, der Kenntnis des therapeutischen Fensters und einer hohen Mortalität und Morbidität

der GvHD wird klar, warum oben genannte Ergebnisse schließlich dazu führten, dass sich die Verhinderung von GvHD zum ersten klinischen Therapieansatz für Tregs entwickelte (Riley, June, and Blazar 2009).

Methodisch lassen sich hierbei für die Vermeidung von Abstoßungsreaktionen und die Induktion von Toleranz prinzipiell drei Herangehensweisen unterscheiden: die *in vivo* Expansion und/oder Induktion von Tregs, die Immuntherapie mittels *ex vivo* expandierter bzw. generierter Tregs und die Immuntherapie mittels frisch isolierter Tregs (Xia, Shah, and Luo 2009).

### 1.3.2. *in vivo* Aktivierung von Tregs

Zahlreiche Protokolle zur Toleranzinduktion nach Transplantation konnten die *in vivo* Expansion bzw. Induktion von Tregs als einen bedeutenden Mechanismus identifizieren (Xia, Shah, and Luo 2009). In diesen Protokollen wurden u.a. anti-CD3- und anti-CD154-Antikörper sowie „tolerogene DCs“ verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass anti-CD3 mAbs zum einen T-Zell-Anergie auslösen, zum anderen zu einem Anstieg der Treg Population führen, welcher wiederum TGF $\beta$  abhängig ist. Hierbei spricht man von der sogenannten „infektiösen Toleranz“, einem Phänomen, bei welchem durch TGF $\beta$  produzierende Phagozyten (stimuliert durch die anti-CD3 getriggerte Apoptose von T-Zellen) iTregs induziert werden, die ihrerseits wiederum TGF $\beta$  produzieren und weitere Tregs rekrutieren (Perruche et al. 2008). Ein weiterer Toleranzmechanismus besteht in der Verbesserung der suppressiven Funktion von Tregs durch Gabe von anti-CD154 mAbs, da CD154 die inhibitorische Funktion von Tregs zu hemmen scheint (Quezada et al. 2005). Auch eine Blockade des kostimulatorischen CD4 mittels anti-CD4 mAb oder die Gabe von Rapamycin (siehe auch 1.3.3.) treffen verstärkt Teff Zellen und erlauben so eine selektive Anreicherung von Tregs (Miyara, Wing, and Sakaguchi 2009). Eine neuere Methode der Toleranzinduktion besteht in der *in vitro* Generierung oder *in vivo* Induktion sogenannter „tolerogener DCs“, die keinen Reifungsprozess durchlaufen, Teff Zellen inhibieren und Tregs stimulieren können (Morelli and Thomson 2007).

Eine Möglichkeit eher Antigen-spezifische Tregs *in vivo* zu stimulieren, welche z.B. bei Allergenspezifischer Immuntherapie (SIT) Verwendung findet, besteht in der wiederholten Gabe (s.c. oder s.l.) eines niedrig dosierten Antigens. Da Tregs den Thymus bereits in einem *antigen primed* Zustand verlassen, können sie durch deutlich geringere Antigendosen zur Suppression angeregt werden als für die Aktivierung von anderen T-Zellen nötig ist. Somit kann eine Art Vakzinierung bei gleichzeitiger Inhibition der Teff Zellen stattfinden um in Autoimmunerkrankungen mit bekannten Selbst-Antigenen Toleranz zu induzieren (Beispiele: Insulin bei Diabetes mellitus Typ 1, Acetylcholin bei Myasthenia gravis, Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase bei Hashimoto Thyreoidits u.a.) (Strauss et al. 2007; Nagahama et al. 2009).

Denkbar erscheint auch die Gabe von IL-2 zur Aufrechterhaltung der Treg-Population bei gleichzeitiger Apoptose-Induktion in aktivierten T-Zellen. Wegen der pleiotropen Effekte ist der Ausgang einer Behandlung mit IL-2 *in vivo* jedoch schwer vorherzusehen (Miyara, Wing, and Sakaguchi 2009).

Wie anhand der Beispiele zu sehen ist, kann mit Hilfe von Antigenosierung, Zytokinen, Antikörpern oder der Modifizierung von DCs auf verschiedenem Wege die Balance zwischen Teff Zellen und Tregs zugunsten einer Expansion letzterer verschoben werden. Dieser Ansatz zur Toleranzinduktion ist jedoch mit Risiken verbunden. Da eine exklusive *in vivo* Aktivierung von Tregs nicht erreicht wird, bringt jeder Einfluss von außen immer auch eine Stimulation anderer T-Zellen mit sich, was zu dramatischen Konsequenzen führen kann, wie eine klinische Phase 1 Studie mit anti-CD28 mAbs zeigte. Während diese Antikörper in präklinischen Modellen v.a. Tregs aktivierten, führte die Behandlung bei gesunden Patienten zu massiven systemischen Entzündungsreaktionen (Suntharalingam et al. 2006). Eine möglicherweise bessere Alternative zur Manipulation von Tregs *in vivo* ist daher die adoptive Zelltherapie mit *ex vivo* kultivierten oder frisch isolierten Tregs, die momentan im Fokus vieler Arbeiten liegen (Riley, June, and Blazar 2009).

### 1.3.3. Transfer nach *ex vivo* Aktivierung bzw. Expansion

#### *nTregs*

Will man funktionsfähige regulatorische T-Zellen – Antigen-spezifisch oder –unspezifisch – für die therapeutische Anwendung *ex vivo* kultivieren, sollten sie vor einem Zelltransfer bestimmte Charakteristika unbedingt aufweisen. So müssen sie in „ausreichender“ Menge vorhanden sein, Foxp3 exprimieren, *in vivo* überleben und ihren Phänotyp stabil aufrechterhalten, zum Ort der Entzündung/Abstoßungsreaktion migrieren und schließlich ihre suppressive Funktion ausüben können (Muthukumar et al. 2005). Für die Expansion selbst sind zumindest die Stimulation des TCR, ein zweites, kostimulatorisches Signal, sowie die Anwesenheit von IL-2 notwendig. Antigen-spezifische, in Anwesenheit von DCs kultivierte nTregs scheinen im Vergleich zu unspezifischen (anti-CD3, anti-CD28 Stimulierung) nTregs stärker suppressiv, wobei jedoch die Expansion letzterer wesentlich effizienter ist (Yamazaki et al. 2006). Ein Problem bei Treg-Kulturen ist die Stabilität des Phänotyps. Ein aktivierungsabhängiger Verlust der Foxp3 Expression von bis zu 70% nach gut zwei Wochen Expansion wurde beobachtet (Xia, Shah, and Luo 2009) und auch die Konversion in Th1, Th2 oder Th17 Zellen ist möglich (Kasprowicz et al. 2005; Zhou et al. 2008). Zugabe von TGF $\beta$  kann den Foxp3 Verlust aufhalten und nach Expansion sogar in erhöhter Foxp3 Expression *in vivo* resultieren (Xia, He, and Leventhal 2008) – im Gegensatz zu iTregs, welche gerade *in vivo* Foxp3 verlieren. Des Weiteren kann durch Zugabe von Retinsäure und Trichostatin A (ein Histon-Deacetylase-Inhibitor) die Foxp3 Expression weiter konserviert und eine Th17 Differenzierung unterbunden werden (Xia, Shah, and Luo 2009). Eine Beeinträchtigung der Migrationsfähigkeit und des *homing* von expandierten Tregs wurde

bisher nicht festgestellt (Xia et al. 2006). Durch Kultivierung der Tregs in Anwesenheit von Knochenmarks-DCs wird Antigenspezifität erreicht. *In vivo* konnte daraufhin eine stabile Toleranz-Induktion, vermutlich ebenfalls durch bereits oben genannte „infektiöse Toleranz“ beobachtet werden (Cobbold et al. 2004). Eine robuste Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen wurde mit *ex vivo* expandierten nTregs bisher stets im Verhältnis Treg : Teff = 1:1 erreicht. Allerdings ist sowohl im Mausmodell wie auch beim Menschen noch völlig unklar, welche Zellzahlen tatsächlich nötig sind (Xia, Shah, and Luo 2009).

Das Hauptproblem der *ex vivo* Kultivierung und Expansion isolierter nTregs ist die Kontamination mit anderen Zellpopulationen. Auch wenn mit zusätzlichen Markern wie CD45RA oder CD127 versucht wird möglichst reine Ausgangspopulationen zu isolieren, ist die im Augenblick verwendete Markercharakterisierung für nTregs immer noch ungenügend (siehe 1.2.2.1.). Auch geringe Kontamination mit Teff Zellen führt in Anwesenheit von IL-2 so zu einer, im Vergleich zu den *in vitro* eher langsam wachsenden Tregs signifikanten Proliferation der für den Patienten potentiell gefährlichen T-Zell Subpopulation (Levings, Sangregorio, and Roncarolo 2001). Eine alternative Möglichkeit, welche nicht versucht die Reinheit durch zusätzliche Marker zu verbessern, sondern eben genannten Proliferationsvorteil der Teff Zellen angreift, besteht in der Zugabe des mTOR Inhibitors Rapamycin, welcher selektiv Wachstum und Funktion der Teff Zellen inhibiert (Battaglia, Stabilini, and Roncarolo 2005). Allerdings induziert Rapamycin auch die Foxp3 Expression in normalen T-Zellen, wodurch nun eine Kontamination mit iTregs nicht mehr auszuschließen ist (Long and Buckner 2008). Ein weiteres Problem besteht in der Frage der Stabilität expandierter nTregs. Da bereits *in vitro* Konversionen in andere Zelltypen beschrieben wurden, steht zu befürchten, dass dies *in vivo* in noch größerem Maße geschehen kann. Umso wichtiger ist eine exaktes *monitoring* der Zellen und Kulturbedingungen, welche ein hohes Expressionslevel an Foxp3 sichern (Miyara, Wing, and Sakaguchi 2009).

#### *iTregs*

Da das Hauptproblem bei der Expansion von nTregs die Kontamination ist, würden Kulturbedingungen, welche die zuverlässige Konversion von normalen T-Zellen in iTregs gewährleisten das Problem der Reinheit auflösen. Weiterhin hätte man für die Expansion auch die wesentlich größere Ausgangspopulation an Foxp3- CD25- T-Zellen zu Verfügung (Xia, Shah, and Luo 2009). Ein weiterer Vorteil der iTregs besteht darin, dass sie relativ einfach gezielt gegen ein Antigen hergestellt werden können (Miyara, Wing, and Sakaguchi 2009). Wie bereits beschrieben (siehe 1.2.2.2.) können iTregs durch anti-CD3 und anti-CD28 im Beisein von TGFβ generiert werden. Trotz der vielen theoretischen Vorteile dieser Zellen wurde bereits in Mäusen gezeigt, dass die Foxp3 Expression von iTregs nicht stabil ist (Floess et al. 2007) – zudem scheinen humane iTregs *in vivo* überhaupt keine suppressiven Eigenschaften zu besitzen (Tran, Ramsey, and Shevach 2007).

#### 1.3.4. Transfer frisch isolierter Tregs

Um die zahlreichen Probleme einer *in vitro* Expansion zu umgehen, gibt es aktuell erste Versuche die Methode des direkten Zelltransfers frisch isolierter allogener Tregs vom Mausmodell in die klinische Anwendung zu übertragen. Die große Hürde hierbei ist jedoch die geringe Frequenz der nTregs im peripheren Blut und – verbunden mit der dadurch erschwerten Aufreinigung – wiederum die Gefahr der Kontamination. Für den ersten klinischen Versuch eines Tregs-Transfers in Menschen wurden daher auch Zellen aus dem Treg-reicheren Nabelschurblut transplantiert. In dieser Studie aus dem Jahr 2011 erhielten 23 Patienten nach einer *double umbilical cord blood transplantation* (UCBT) zusätzlich daraus isolierte, allerdings hier noch *in vitro* expandierte, Tregs mit dem Ziel, GvHD zu verhindern. Es wurden  $1 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^6$  Zellen/kg Körpergewicht (KG) (mittels anti-CD25 paramagnetischen *beads* angereichert, durchschnittlich 64% Foxp3<sup>+</sup>) gegeben und zusätzlich eine übliche pharmakologische GvHD Prophylaxe verabreicht. Die Studie konnte zwar den Beweis einer GvHD Inhibition durch Tregs aus methodischem Grund nicht führen, zeigte jedoch das Überleben der Tregs *in vivo* und des Weiteren keinerlei toxischen Effekt durch den Zelltransfer (Brunstein et al. 2011). Aufbauend auf diesem Erfolg führten Edinger *et al.* in einer kleinen Studie an 9 Leukämiepatienten den ersten direkten Transfer von  $5 \times 10^6$ / kg KG (>50% Foxp3<sup>+</sup>) frisch isolierter Donor-Tregs nach HSZT durch. Zusätzlich wurde eine GvHD Prophylaxe über ein Jahr verabreicht. Wie zuvor bei den UCBT-Patienten konnten auch hier keinerlei toxische Effekte und keine GvHD beobachtet werden (Edinger and Hoffmann 2011). Im selben Jahr veröffentlichte eine italienische Arbeitsgruppe das noch eindrucksvollere Ergebnis einer Studie an 28 HSZT-Patienten, welche haploidentisch transplantiert werden sollten. Diese erhielten vier Tage vor HSZT frisch isolierte Tregs ( $2 - 4 \times 10^6$ /kg KG; Isolierung mittels paramagnetischer *beads*; durchschnittlich 69% Foxp3<sup>+</sup>) als einziges immunsuppressives Therapeutikum. Die Anzahl der für eine ausreichende GVL (*graft versus leukemia*) Aktivität essentiellen Teff Zellen betrug  $2 \times 10^6$ / kg KG, was mit einem hohen Risiko für schwere GvHD einhergeht. Trotzdem entwickelten nur zwei von 28 Patienten eine akute GvHD, obwohl mangels pharmakologischer Kontrolle in allen Patienten eine schwere Entzündungsreaktion erwartet worden wäre (Di Ianni et al. 2011).

Viele Ungewissheiten bleibt es dennoch zu klären. So zeigen diese aktuellen Daten erneut, dass das Hauptproblem der Reinheit weiterhin besteht und die Gefahr, eine GvHD durch Kontamination mit alloreaktiven Teff Zellen noch zu verschlimmern, nicht unterschätzt werden darf. Gleichzeitig bleibt ebenso unklar, wie viele Zellen tatsächlich und zu welchem optimalen Zeitpunkt für einen Transfer nötig sind.

#### 1.3.5. Zelltherapeutische Ansätze außerhalb der Transplantationsmedizin

Wie bereits erwähnt, ist das Feld potentieller therapeutischer Anwendungen von Tregs breit und die Verhinderung von GvHD nur ein früh erkanntes Potential dieser Zellen. Zahlreiche weitere Versuche



wurden unternommen um Beobachtungen im Mausmodell auf die Therapie von Krankheiten des Menschen zu übertragen.

2005 konnte eine Studie an CIA (*collage-induced arthritis*) Mäusen den positiven Effekt von Tregs auf dieses murine Pendant zu RA beim Menschen zeigen. Im Vergleich zu anderen Modellen, wie den oft verwendeten Colitis Mäusen handelt es sich hier um eine systemische Autoimmunerkrankung, die einen Treg-Transfer vor neue Herausforderungen stellt – ebenso wie die Tatsache, dass RA-Patienten hohe Level an IL-6, IL-1 oder TNF $\alpha$  aufweisen, durch welche die Suppression von Tregs gehemmt wird. Dennoch konnte eine Migration von Tregs in die entzündeten Gelenke zusammen mit einer erhöhten IL-10 Produktion nachgewiesen werden und ein einmaliger Transfer von  $10^6$  Zellen schien den Krankheitsprogress deutlich zu verlangsamen (M. E. Morgan et al. 2005). Neuere Versuche zeigten zudem Erfolge mit UCBT in RA-Mäuse (Y. Liu et al. 2010).

Ein anderes Beispiel ist SLE. Wenngleich die Datenlage hier noch uneindeutig ist (siehe 1.2.2.4. *human*) konnte 2007 nachgewiesen werden, dass dysfunktionelle Tregs von SLE-Patienten durch *ex vivo* Expansion ihre Funktion wiedererlangten (Valencia et al. 2007). Möglicherweise wäre die autologe Zelltransplantation expandierter Tregs ein guter Ansatz (Riley, June, and Blazar 2009).

Ähnlich verhält es sich bei Patienten mit Sjögren-Syndrom, die deutlich niedrigere Treg-Frequenzen besitzen. Eine Studie von 2012 konnte sowohl im Mausmodell als auch in Patienten mit Sjögren-Syndrom eine deutliche Besserung der Erkrankung nach mesenchymaler Stammzelltransplantation zeigen. Hierbei wurde ein *shift* der T-Zellen Richtung Tregs und Th2 und eine Suppression von Th17 Zellen nachgewiesen (Xu et al. 2012).

Im EAE Modell und MS-Patienten scheint der Nutzen einer Zelltherapie mit Tregs noch nicht eindeutig. So zeigen viele Daten, dass Teff Zellen im inflammatorischen Milieu gegen eine Suppression durch Tregs resistent sind. Daher gibt es Ansätze mit anti-entzündlichen Stoffen wie  $\alpha$  1-Antitrypsin das Feld für einen Treg-Transfer zu ebnen (Lewis et al. 2008; Riley, June, and Blazar 2009). Zudem zeigen jüngere Daten, dass mittels HSZT an Mäusen eine Induktion von Tregs, erhöhte Level an Foxp3 und eine Verbesserung der EAE erreicht werden können (Meng et al. 2011).

Als Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) und andere Autoimmundefekte ist die Colitis Maus ein weitverbreitetes Forschungsobjekt, insbesondere für mögliche Treg-Therapien. 2003 bereits konnten Mottet *et al.* deutlich machen, dass sich in kranke Mäuse transferierte Tregs in der *Lamina propria* des Darms anreichern, die entzündete Schleimhaut histologisch vollständig wiederherstellen und die Colitis ausheilen konnten (Mottet, Uhlig, and Powrie 2003). Da jedoch CEDs keine unmittelbare Lebensbedrohung darstellen – im Gegensatz zu häufigen Situationen in Transplantations-Studien – , das *monitoring* des Krankheitsverlauf hier wesentlich schwieriger ist und robuste pharmakologische Therapien existieren, gibt es auf diesem Gebiet trotz vielversprechender Daten im Mausmodell bisher noch keinen veröffentlichten Heilversuche am Patienten (Himmel et al. 2012).

Dennoch bleibt das Feld der CEDs neben der Transplantationsforschung ein Hauptziel für die Anwendung von Tregs – ebenso wie Diabetes mellitus Typ 1.

Bereits früh konnte gezeigt werden, dass Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) u.a. eine mangelnde Kontrolle Inselzell-spezifischer T<sub>H</sub>1 Zellen durch Tregs zugrunde liegt, manche T1DM Patienten niedrige Treg-Frequenzen besitzen und diese eine geringere suppressive Funktion aufweisen – bzw. T<sub>H</sub>1 Zellen eine erhöhte Suppressions-Resistenz (Kukreja et al. 2002; Schneider et al. 2008; Lindley et al. 2005). Im diabetischen Mausmodell wurde bereits in den 90er Jahren deutlich, dass eine Toleranzinduktion mittels anti-CD3 mAbs (siehe 1.3.2.) möglich ist (Chatenoud et al. 1994). Neuere Studien konnten diesen Erfolg auch bei T1DM-Patienten wiederholen (Herold et al. 2002). 2005 wurde daraufhin nachgewiesen, dass Patienten mit neu aufgetretenem T1DM durch anti-CD3 mAb Therapie geringeren Insulin-Bedarf entwickelten (Keymeulen et al. 2005). Parallel hierzu zeigten weitere Daten, dass adoptiver Transfer frisch isolierter oder expandierter Tregs im Mausmodell die pathologische Autoimmunität stoppen und Normoglykämie wiederherstellen konnte (Szanya et al. 2002; Tang et al. 2004; Tarbell et al. 2007). Auf Grund dieser vielversprechenden Ergebnisse ist Diabetes mellitus Typ 1 nach GvHD das zweite Behandlungsziel, bei dem nun der Schritt in die Klinik gewagt wurde. So läuft aktuell die erste Phase 1 Studie mit *ex vivo* expandierten, autolog transferierten Tregs an T1DM Patienten (UCSF 2000-2015).

Mit Blick auf diese Beispiele scheinen Tregs zahlreiche Eigenschaften zu besitzen, die sie zu einem geeigneten Therapeutikum machen. So kommen sie natürlicherweise im Körper vor und können phänotypisch von anderen T-Zellen abgegrenzt werden. Sie besitzen ein breites TCR Repertoire und verlassen den Thymus bereits in einem *antigen-primed* Zustand, so dass sie *in vivo* bereits durch geringe Mengen an Antigen aktiviert werden können. Ihr Phänotyp wie ihre Funktion sind stabil, so dass sie ihre suppressiven Eigenschaften auch bei klonaler Vermehrung bewahren – das macht *ex vivo* Expansion oder *in vivo* Induktion erst möglich. Dieses Potential zur Toleranzinduktion gegen Alloantigene auf der einen und Abwehr autoreaktiver Immunantworten auf der anderen Seite scheint groß und zahlreiche vielversprechende Ansätze auf Gebieten der Transplantation, bei Allergien, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder der Stärkung föto-maternaler Toleranz werden aktuell entwickelt (Sakaguchi, Wing, and Miyara 2007).

Gleichwohl gilt es noch eine Reihe von Hürden zu überwinden. So wird noch mehr Wissen über die Mechanismen der Suppression *in vivo* nötig sein um beantworten zu können, was tatsächlich mit Tregs bei Aktivierung oder Transfer *in vivo* geschieht, welche Mengen an IL-2 Tregs *in vivo* benötigt werden, was passiert, wenn dieser Bedarf nach *in vitro* Expansion und *in vivo* Transfer nicht gedeckt wird und ob dies zu Zelltod oder Konversion der transferierten Tregs führen kann. Unklar ist außerdem, wie lange transferierte Tregs *in vivo* überleben und ob oder wie lange dies überhaupt notwendig ist oder ob Mechanismen wie infektiöse Toleranz an dieser Stelle übernehmen. Auf technischer Seite bleibt das

Hauptproblem der Reinheit bei Isolierung und Kultivierung der Tregs bestehen. So mangelt es weiterhin an selektiven Oberflächenmarkern und optimalen Zellkulturbedingungen, welche das Wachstum von Tregs exklusiv fördern um potentiell lebensgefährliche Kontaminationen zu minimieren. GMP (*good manufacturing practice*) Bedingungen für Reinheit, Sterilität, Identität und Funktionalität müssen erreicht werden um Therapieansätze aus dem Labor in die Klinik zu bringen, wobei beispielsweise nicht klar ist, wie hoch Verunreinigungen mit anderen Zellen wirklich sein dürfen, ehe sie den Patienten gefährden. Während die Sterilität das kleinere Problem darstellt, bleibt auch die Feststellung von Identität und Funktionalität der zu transferierenden Zellen schwierig (Riley, June, and Blazar 2009). Das Fehlen eindeutiger, unikaler Treg-Marker ist ebenso noch Stand der Forschung, wie Fragen nach besseren Assays um *in vitro* oder *in vivo* die Funktionalität von Tregs eindeutig zu belegen. Letztendlich bleibt zu klären, ob und unter welchen Bedingungen die Gefahr bestünde, durch diese neuartigen Therapieansätze und deren mögliche Kombinationen das Immunsystem in zu großem Maße unspezifisch zu bekämpfen, was wiederum eine Vielzahl weiterer Probleme zur Folge hätte.

#### 1.4. PROBLEME DER AUFREINIGUNG

Obwohl Tregs interessante therapeutische Möglichkeiten versprechen, ist der Weg zu ihrer klinischen Anwendung nicht leicht. Zum einen ist eine höchstmögliche Reinheit bei der Isolierung der Zellen unabdingbar und erste Voraussetzung für eine Anwendung ohne Gefährdung des Patienten durch alloreaktive Treg Zellen. Solche Reinheiten werden am ehesten durch positive Anreicherung erzielt. Zum anderen basieren zahlreiche zelltherapeutische Protokolle noch immer auf positiver Anreicherung mit nur einem Oberflächenmarker (z.B. CD34 bei HSZT) (Nadali, de Wynter, and Testa 1995). Beides jedoch ist im Falle von Tregs mit den bisherigen Methoden nicht realisierbar. Zum einen erfordert der Mangel an wirklich spezifischen Oberflächenmarkern für Tregs eine ganze Palette an Markerkombinationen um diese kleine Population zuverlässig abzugrenzen, zum anderen ist eine, gemäß dieser Kombinationen, mehrstufige positive Anreicherung mittels magnetischer *beads* (MACS) aus methodischen Gründen bisher nicht möglich. Zwar sind solche Multiparameter-Isolierungen einer Zellpopulation kein Problem für durchflusszytometrische Verfahren, doch stehen hier wiederum die Bemühungen, FACS-basierte Isolierungsmethoden unter GMP-Bedingungen in die klinische Anwendung zu transferieren noch am Anfang (Stemberger et al. 2012). Daher wurde in jüngerer Vergangenheit vermehrt versucht, Tregs über eine Kombination aus Depletion und positiver Anreicherung zu isolieren. Doch erzielen Methoden, welche die Zielpopulation über komplexe Depletion zahlreicher Zelltypen gefolgt von einem finalen Anreicherungsschritt mittels MACS isolieren oftmals wesentlich niedrigere Reinheiten und sind neben einem großen Aufwand auch sehr kostspielig.

Unabhängig von der Frage nach Reinheiten und der Wahl einer optimalen Technik zur Isolierung der Zielpopulation besteht jedoch ein weiteres intrinsisches Problem. Denn nach Antikörperfärbung wie auch nach Behandlung mit paramagnetischen *beads* sind die Oberflächenmoleküle der Zielzellen maskiert mit Fremdkörpern – je komplexer die Markerkombination, desto mehr Oberflächenmoleküle werden besetzt. Gemeinsam mit diesen gebundenen Antikörpern oder *beads* würden die Zielzellen nun in den Patienten transferiert. Dieser Zustand aber stellt den Transfer der Treg-Therapie in die klinische Routine vor eine Reihe weiterer Probleme. Einerseits wird mit diesen, auf den Zellen verbleibenden Fremdkörpern verändertes Zellmaterial, das potentiell immunogen, allergen oder gar giftig ist in den menschlichen Organismus übertragen, – dies auszuschließen erschwert die Genehmigungsverfahren solcher Therapieansätze enorm. Neben diesen regularischen Problemen ist vielmehr jedoch die Frage zu klären, inwieweit eine Antikörperfärbung oder *bead*-Behandlung von Zellen diese selbst in ihrer Funktion beeinträchtigen oder modifizieren – insbesondere wenn isolierte Tregs vor Transfer *ex vivo* expandiert werden. Für die Zelle wichtige Signalmoleküle könnten so blockiert, aktiviert oder nach Bindung internalisiert werden und hierüber die Funktion und Vitalität der Zellen beeinflussen. Beispiele wie T-Zell Aktivierung durch anti-CD3 mAbs oder funktionelle Beeinträchtigung von Tregs durch anti-CD25 mAbs zeigen, dass dieses Problem und seine Relevanz für neue zelltherapeutische Ansätze untersucht werden sollte (Kjer-Nielsen et al. 2004; Chatenoud 2003; Kohm et al. 2006; Knabel et al. 2002). Eine solche Überprüfung auf potentielle Funktionsbeeinträchtigung durch Antikörperbeladung, die Analyse eventueller Zellveränderungen nach Isolierung und Expansion oder gar ein *monitoring* nach Transfer *in vivo* sind schwierig, insbesondere bei komplexen Färbekombinationen wie im Falle der Anreicherung von Tregs. Daher würde eine Umgehung dieses Problems verbleibender Färb- und Markierungsreagenzien auf der Zelloberfläche einen großer Schritt vorwärts bedeuten. Hierzu konnten Kleinewietfeld *et al.* 2009 zeigen, dass es möglich ist, Tregs nahezu „*untouched*“ zu gewinnen, indem aus MACS-angereicherten CD4+ Zellen alle nicht-regulatorischen Populationen durch CD127, CD49d Depletion abgereichert wurden. Tregs, welche für CD127 und CD49d jeweils negativ sind, blieben als einzige übrig (Kleinewietfeld et al. 2009). Allerdings konnte diese Methode wiederum keine Abhilfe für die prinzipiellen Probleme einer Anreicherung durch Depletion schaffen.

Eine Alternative zu den bisher erläuterten konventionellen Möglichkeiten der Anreicherung und Isolierung von Tregs, welche die Vorteile positiver mit mehrschrittiger, sogenannter serieller Anreicherung verbindet und die geschilderten Probleme und potentiellen Gefahren verbleibender Oberflächenreagenzien umgehen könnte, bietet die noch relativ junge Technologie der reversiblen Färbung die im folgenden Abschnitt behandelt wird.

## 1.5. DIE ALTERNATIVE – VON MHC-MULTIMEREN ZU FAB-STREPTAMEREN

### 1.5.1. MHC-Multimere

Ab Mitte der 90er Jahre wurden verschiedene Versuche unternommen, antigen-spezifische T-Zellen zu isolieren um sie für *in vitro* Analysen und *in vivo* Studien nutzbar zu machen. Bald schon stellte sich jedoch heraus, dass eine Aufreinigung spezifischer T-Zellen, unabhängig von ihrem Differenzierungs- oder Aktivierungszustand, allein mit Hilfe von MHC-Multimeren möglich war. Diese Technologie nutzte das MHC-Peptid, den natürlichen TCR-Liganden, als Färbereagenz. Da jedoch die Affinität einer MHC-TCR Interaktion alleine zu niedrig ist um eine stabile Bindung auszubilden, wurden MHC-Multimere (ursprünglich: Tetramere) generiert (Altman et al. 1996), welche durch eine erhöhte Avidität zuverlässig an TCRs binden konnten. Mit dieser Methode gelang es in den folgenden Jahren zahlreiche antigen-spezifische T-Zellpopulationen im Tiermodell, wie auch im Menschen zu charakterisieren (Busch et al. 1998; Stemberger et al. 2007; Novak et al. 1999). MHC-Multimere hatten jedoch den Nachteil, dass sie nur bei 4°C funktionierten. Eine Färbung bei Raumtemperatur führte zu TCR-Internalisierung, Aktivierung, Toleranzinduktion und Zelltod, da die MHC-TCR Interaktion einen physiologischen Stimulus für die T-Zelle darstellt und eine permanente Bindung durch Multimerkomplexe zum Funktionsverlust der Zellen führt (Maile et al. 2001). Dieses Manko verhinderte eine *in vivo* Nutzung der MHC-Multimere und somit auch die klinische Anwendung antigen-spezifischer T-Zellen (Knabel et al. 2002). 2002 jedoch beschrieben Knabel *et al.* die Entwicklung einer reversiblen Färbung auf Basis der MHC-Multimere, die sogenannten MHC-*Streptamere*. Für das Prinzip der reversiblen Multimerfärbung kam die aus der Proteinchemie bekannte *Strep-tag/Strep-Tactin* Technologie zur Anwendung. Ein MHC-Molekül wird hierfür mit einem speziellen, acht Aminosäuren langen Peptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), dem *Strep-tag* fusioniert, welches wiederum in der D-Biotin-Bindungstasche eines modifizierten Streptavidins, dem sogenannten *Strep-Tactin* bindet. Ein *Strep-Tactin* verfügt insgesamt über vier dieser Bindungstaschen. Durch Multimerisierung des *Strep-Tactin*-Moleküls wird diese Zahl nochmals erhöht. Binden nun solche rekombinanten MHC-Moleküle, wird ein sogenanntes MHC-Multimer generiert. *Strep-Tactin*, als Rückgrad des Konstrukts kann nun mit einem Fluorochrom, über welches die FACS-basierte Detektion ermöglicht wird, versehen werden. Der Schlüssel zur Reversibilität eines MHC-*Streptamers* liegt nun in den Bindungsaffinitäten der einzelnen Partner. So beträgt die Dissoziationskonstante einer *Strep-tag/Strep-Tactin* Bindung ca.  $K_D=10^{-6}$  M, weshalb der Kompetitor D-Biotin mit seiner wesentlich höheren Affinität zu *Strep-Tactin* ( $K_D=10^{-12}$  M) die MHC-*Strep-tag* Moleküle leicht aus ihrer Bindung verdrängen kann. Bereits eine niedrige Konzentration an D-Biotin führt so in kürzester Zeit zum Aufbrechen des Multimerkomplexes. Da jetzt aber nurmehr einzelne MHC-TCR-Bindungen zurückbleiben, die ihrerseits eine zu niedrige Affinität für eine stabile Bindung aufweisen, kommt es zur spontanen Abdissoziation der MHC-*Strep-tag* Moleküle von der Zelloberfläche. Somit erlaubt die

MHC-Streptamer Färbung eine stabile Bindung und Detektion antigen-spezifischer T-Zellen bei niedrigen Temperaturen, ohne dass es zu Interaktionen oder einer funktionellen Beeinträchtigung der Zellen kommt. Nach Isolierung der Zielpopulation kann durch Zugabe von D-Biotin das gesamte Färbereagenz von der Zelloberfläche entfernt und die Zellen nun bei physiologischen Temperaturen und ohne weiteren Stimulus *in vivo* weiterverwendet werden. Hinzu kommt, dass Biotin (Vitamin H) als Naturstoff nicht giftig ist und die verwendeten Konzentrationen zusätzlich so gering sind, dass selbst der Transfer eventueller Biotin-Rückstände zusammen mit T-Zellen in den menschlichen Organismus als unbedenklich eingestuft wird (Knabel et al. 2002).

Mit der Entwicklung von MHC-Streptameren und Dank der Vorteile einer reversiblen Färbung wurde die Möglichkeit geschaffen antigen-spezifische T-Zellen in die klinische Anwendung zu bringen (Schmitt et al. 2011).

### 1.5.2. FAB-Streptamere

Während MHC-Multimere auf die Detektion und Isolierung von T-Zellen begrenzt bleiben, konnte die Technologie der reversiblen Färbung vor kurzem weiterentwickelt werden. Durch die Verwendung niedrig-affiner Fab-Moleküle anstelle von MHCs, gelang es Multimere herzustellen, die reversibel sind und gleichzeitig die Spezifität des jeweiligen parentalen Antikörpers besitzen. Diese Fab-Streptamere wurden in unserem Labor in paralleler Arbeit für humane und murine Zellen generiert und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

#### *Antikörper- und Fab-Struktur*

Wie bereits erwähnt, werden für diese neuen Reagenzien anstelle der MHC-Moleküle Antikörperfragmente verwendet. Ein parentaler IgG Antikörper für solch ein Konstrukt ist ca. 150kDa groß und besteht aus zwei leichten (je ca. 25 kDa, ca. 220 Aminosäuren/AAS) und zwei schweren (je ca. 50 kDa, ca. 450 AAS) Ketten. Dabei besteht eine schwere Kette aus drei konstanten Regionen  $C_{H1} - 3$  (330 AAS mit *Hinge* Region) und einer variablen Region ( $V_H$  ca. 110 AAS). Die leichte Kette besteht aus nur einer konstanten (110 AAS) und einer variablen Region (110 AAS). Letztere wiederum setzt sich aus drei hochvariablen CDRs (*complementarity determining regions*, 1-3) zusammen, welche durch konservierte *framework regions* voneinander getrennt sind. Die leichte Kette kommt bei Säugern in den Formen Kappa und Lambda vor, die sich jeweils in der konstanten Region unterscheiden – murine Antikörper enthalten vor allem Kappa-Leichtketten. Ein IgG-Antikörper setzt sich so aus zwei Fab-Fragmenten (*Fragment antigen binding*, je ca. 50kDa) und einem  $F_c$ -Teil (*crystallisable Fragment*, ca. 50kDa) zusammen, wobei dieser aus den  $C_{H2}$  und 3 der beiden schweren Ketten aufgebaut wird. Ein Fab-Fragment alleine besteht also aus einer variablen Region der schweren Kette ( $V_H$ ) und einer variablen Region der leichten Kette ( $V_L$   $\kappa$  oder  $\lambda$ ) mit jeweils einer zugehörigen konstanten Region ( $C_{H1}$  bzw.  $C_L$ ).

### *Fab-Multimere*

Jedes Fab für sich genommen hat, wie zuvor das MHC-Molekül (siehe 1.5.1.), eine zu niedrige Affinität zu seinem Antigen bzw. muss durch Modifizierung der Aminosäuresequenz in einen solchen niedrig-affinen Zustand versetzt werden (siehe 3.2.3). Somit ist im monomeren Zustand keine stabile Antigen-Antikörper Bindung möglich. Durch Fusion des Fab-Fragments mit einem *Strep*-tag und Multimerisierung mehrere Fab-*Strep*-tags auf einem Fluoreszenz-markierten *Strep*-Tactin Rückgrad entsteht in Analogie zu den MHC-*Streptameren* ein Färbekomplex, der zugleich eine stabile Bindung und reversible Färbung ermöglicht. So können die Fab-*Streptamere* nach Färbung und Isolierung der entsprechenden Antigen-tragenden Zielpopulation durch Zugabe von D-Biotin und die folgende Verdrängung der *Strep*-tags vom *Strep*-Tactin Rückgrad monomerisiert werden. Die einzelnen Fab-Fragmente schließlich dissoziieren auf Grund ihrer niedrigen Affinität spontan von der Zelloberfläche ab. Zurück bleiben schonend aufgereinigte Zellen, die keinerlei Fremdmaterial auf ihrer Oberfläche tragen.

Diese Idee, eine einfache und schonende Isolierung auch kleiner Zellpopulationen mittels reversibler Färbung nicht nur auf spezifische T-Zellen anzuwenden, sondern sie prinzipiell auf jeden Oberflächenmarker und damit jeden Zelltyp zu erweitern, steckt hinter dem Gedanken der reversiblen Fab-*Streptamere*. Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse mit MHC-*Streptameren* besteht nun die Hoffnung mit der erweiterten Technologie die Vorteile einer positiven seriellen Anreicherung zu nutzen und gleichzeitig potentielle Probleme konventioneller Antikörperfärbung zu umgehen (siehe 1.4.). Insbesondere bei kleinen, komplex anzufärbenden Zellpopulationen wie Tregs könnten die Vorteile dieser Technologie zum Tragen kommen. So schaffen hochrein isolierte Zellen, welche keinerlei Färbereagenz auf ihrer Oberfläche tragen, also in ihrer Funktionalität nicht eingeschränkt sind nicht nur mehr Sicherheit für den Zelltransfer in Patienten. Sie lassen auch hoffen, dass in zukünftigen Zelltherapieansätzen auf langwierige und aufwendige *in vitro* Expansionsschritte verzichtet werden kann.

## 1.6. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DIESER ARBEIT

Wie eingangs erwähnt sind die theoretischen Möglichkeiten einer Steuerung unseres Immunsystems vielfältig. Zahlreiche teils noch experimentelle Behandlungsansätze rücken jedoch die gezielte Zelltherapie immer stärker in den Vordergrund. Dabei treten regulatorische T-Zellen, deren zentrale Bedeutung für immer mehr immunologische Dysfunktionen aufgedeckt werden konnten, besonders in den Vordergrund und befinden sich im Moment an der Schwelle zur klinischen Anwendung. Gleichwohl gibt es noch zahlreiche Hürden zu überwinden. Eine vielversprechende Möglichkeit diese Zellen für eine sichere Behandlung von Patienten erreichbarer zu machen, bietet die reversible Zellmarkierung, welche eine hochreine positive und serielle Anreicherung bei vollständiger Ablösung des eventuell nachteiligen Sortierungsmarkers verspricht.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Prinzip der reversiblen Färbung auf die Treg-typischen Oberflächenantigene CD4 und CD25 in der Maus übertragen werden. Ziel war die Klonierung, Expression und Affinitätsmodifikation erster muriner Fab-Fragmente sowie deren funktionelle Charakterisierung im Vergleich zu konventionell verfügbaren anti CD4- und anti CD25-Antikörpern. Zusätzlich sollte ihr Einfluss bzw. eventuelle Vorteile für die Funktion und Vitalität isolierter Tregs mit Hilfe funktioneller Assays *in vitro*, wie auch *in vivo* nach adoptivem Transfer in verschiedene Mausmodelle untersucht werden.

Das Projekt soll somit als experimenteller Ansatz der Grundlagenforschung verstanden werden, der parallel zu *in vitro* Tests mit humanen reversiblen CD4- und CD25-Fab *Streptameren* durchgeführt wurde. In der Maus sollten damit erste *in vivo* Ergebnisse zu dieser neuen Färbe- und Anreicherungsmethode gewonnen werden, die eine spätere Anwendbarkeit in murinen Krankheitsmodellen zeigen oder absprechen können. Eine erfolgreiche Generierung dieser antiCD4- und antiCD25-*Streptamer* Reagenzien und vielversprechende *in vivo* Ergebnisse mögen die Idee der reversiblen Färbung für Tregs und ihren Einsatz gegen Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen wie GvHD in die Klinik bringen.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. Geräteliste

Gerät	Hersteller
Agarose Gel Dokumentation	BioRad
Biofuge fresco	Heraeus
BioPhotometer	Eppendorf
CyAn ADP LX 314	Beckman Coulter
CyAn ADP P8	Beckman Coulter
Electrophoresis Might Small SE250/260	Hoefer
Electrophoresis Power Supply EPS	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis unit HE33 mini horizontal submarine	Amersham Biosciences
Elektroporator Gene Pulser	BioRad
Entwicklermaschine Western	AGFA
FACSAria	Becton Dickinson
Freezing container Mr. Frosty	Nalgene
FUJI Medical Röntgenfilm	FujiFilm
Gefriertruhe -20°C	Siemens
Gefrierschrank -80°C	Barka
Inkubator Cytoperm 2	Haereus
Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss
Millex Spritzenfilter, 0,22 µm	Millipore
MoFlo Cell Sorter	Beckman Coulter
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Multikanalpipette	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Roth
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
Orbitalschüttler Multitron Version 2	INFORS AG
pH-meter Multical	WTW
Pipetten	Gilson
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Plastikzubehör	Nunc, Falcon, BD, Eppendorf

SDS-PAGE Gelkammer	Amersham
Semi-dry Blotting Apparatur	BioRad
Sorvall RC6+ Centrifuge	Thermo Scientific
Spectra/Por Dialysemembran, MWCO: 6000 - 8000	SpectrumLabs
Spectra/Por Verschlussklammern	SpectrumLabs
Stericup Vakuumfilter, 0,22 µm, 500 ml	Millipore
Sterilbank HERA safe	Heraeus
T3 Thermocycler	Biometra
T3000 Thermocycler	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraspec3000 pro	Amersham Bioscience
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad E100	Lauda
Whatman Papier	Schleicher & Schuell

### 2.1.2. Chemikalien

C h e m i k a l i e n	H e r s t e l l e r
Acrylamid	Roth
Agarose ( <i>electrophoresis grade</i> )	Invitrogen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma
Ampicillin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Gibco
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Roth
CFDA-SE	Sigma
D-Biotin	Invitrogen
Desoxytrinukleotide (dNTPs)	Fermentas
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Roche
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Roche
Dimethylsulfid (DMSO)	Sigma
Diphtherietoxin	Sigma
Dulbecco PBS	Biochrom
Dithiothreitol (DTT)	Stratagene/ Agilent
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O)	Sigma

eF670 proliferation dye	eBioscience
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Roth
Ethanol absolut 99,8% (v/v)	Merck
Ethanol 70% (v/v)	Apotheke des MRI
Ethidiumbromid	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Formaldehyd HCOH	Sigma
Gentamycin	GibcoBRL
Glycerol	Sigma
Golgi-Plug	BD Biosciences
Heparin (Liquemin® N 25000)	Roche
HEPES	Sigma
HCl	Roth
Isopropanol	Apotheke des MRI
Kanamycin	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
L-Glutamine	GibcoBRL
Methanol	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Milchpulver	Roth
NaOH	Roth
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Sigma
Natriumkarbonat anhydr. (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma
NGS	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen
RPMI-Medium	PAA
SDS	Sigma
<i>Strep</i> -Tactin PE	IBA
<i>Strep</i> -Tactin APC	IBA
Silber-Nitrat AgNO <sub>3</sub>	Sigma
TEMED	Invitrogen
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
Tris	Roth

Tris-hydrochloride (Tris-HCl)	Roth
TRI-Reagent®	Sigma
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D galactopyranosid)	Fermentas

### 2.1.3. Enzyme

Enzym	Hersteller
Affinity Script Reverse Transkriptase	Stratagene/ Agilent
Benzoase Nuclease	Novagen
Dpn1	Promega
Pfu DNA Polymerase	Fermentas
Herculase II	Stratagene/ Agilent
Terminale desoxynukleotidyl Transferase (TdT)	Promega

Alle verwendeten Restriktionsenzyme sowie die dazugehörigen Puffern wurden von der Firma Fermentas bezogen.

### 2.1.4. Kit-Systeme

Kit	Hersteller
WesternBlot Chemoluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas
StarGate Combinatorial Cloning Kit	IBA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience

### 2.1.5. Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit Millipore Q destilliertem Wasser hergestellt. Puffer für FACS-Analysen oder sterile Präparationsabläufe wurden zusätzlich mittels Stericup 0,22µm Filter filtriert. Ein geeigneter pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl eingestellt.

2.1.5.1. Allgemeines		
Ammoniumchlorid-Tris (ACT) (bei Raumtemperatur verwenden)	0,17 M 0,30 M	NH <sub>4</sub> Cl Tris-HCl, pH 7,5
Ampicillin	100 mg/ml	in 50% Ethanol/H <sub>2</sub> O
D-Biotin, 10 M Stammlösung	244,31 g 100 ml	D-Biotin H <sub>2</sub> O
CFSE	5 mM	in 8,96 ml DMSO
Diphtherietoxin	1 mg/ml	in H <sub>2</sub> O
eF670 proliferation dye	5 mM	in 126 µl DMSO
FACS-Puffer	500 ml	PBS
	0,5% (w/v)	BSA
Kanamycin	60 mg/ml	in H <sub>2</sub> O
Na-Acetat-Lösung, 3 M	40,8 g 100 ml	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O, pH 5,2
PBS	9,95 g/l	Dulbecco PBS in H <sub>2</sub> O pH 6,0 – 7,7
SC <sup>+</sup>	1 ml 20 ml 23,83 g 4,00 g	β-Mercaptoethanol Gentamycin HEPES L-Glutamin
2.1.5.2. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese		
6x Ladepuffer	100 mg/l 100 mg/l 30% (v/v)	Bromphenolblau Xylenecyanol Glycerol
TAE-Puffer	40 mM 1 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA
2.1.5.3. Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
5x Auftragspuffer	200 mM 400 mM	Tris-HCl pH 6,8 DTT

Trenngel-Puffer	10% (w/v)	SDS
Sammelgel-Puffer	16% (v/v)	Glycerol
Laemmli-Laufpuffer	2 g/l	Bromphenolblau
	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	2 M	Tris-HCl pH 6,8
	2,9 g/l	Tris-HCl pH 8,3
	14,4 g/l	Glycerin
	1,0 g/l	SDS
2.1.5.4. Puffer für Western Blot		
PBT	1x	PBS
Transfer-Puffer	0,05% (v/v)	Tween 20
	5,8 g/l	Tris
	2,9 g/l	Glycerin
Blocking-Puffer	20% (v/v)	Methanol
	1x	PBT
	3% (v/v)	NGS
	50 g/l	Trockenmilchpulver
10x Tris-Glycin	58 g/l	Tris
	29 g/l	Glycin
2.1.5.5. Puffer für Silberfärbung		
Lösung A	50%	Methanol
	5%	Essigsäure
Lösung B	50%	Methanol
Lösung C	0,2 g/l	Natriumthiosulfat
Lösung D	Silbernitrat	0,2 g/100 ml
Lösung E	3 g/100 ml	Natriumcarbonat anhydr. (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )
	25 µl/100 ml	37% HCOH
Lösung F	14 g/l	Na <sub>2</sub> -EDTA

### 2.1.5.6. Puffer für periplasmatische Expression

Puffer W (Waschpuffer)	100 mM	Tris/HCl, pH8
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Puffer P (Aufschlusspuffer)	100 mM	Tris/HCl, pH8
	500 mM	Sucrose
	1 mM	EDTA
Puffer E (Elutionspuffer)	100 mM	Tris/HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2,5 mM	Desthiobiotin, pH8

### 2.1.6. Medien

Medium	Zusammensetzung	
RP10 <sup>+</sup> Zellkultur Medium (für die Anzucht der Hybridome sowie alle FACS Experimente mit murinem Zellmaterial)	1x	RPMI 1640
	10% (v/v)	FCS
	5% (v/v)	SC <sup>+</sup>
LB <sub>0</sub> (Luria-Bertani)- Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	20 g/l	Agar (für Platten)
	pH 7,0	(NaOH)
	Autoklavieren	
LB <sub>Amp</sub> - Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	20 g/l	Agar (für Platten)
	pH 7,0	(NaOH)
	Autoklavieren;	nach Abkühlung:
		50 mg/l Ampicillin
LB <sub>Kana</sub> -Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

	20 g/l pH 7,0 Autoklavieren;	Agar (für Platten) (NaOH) nach Abkühlung: 10 mg/l Kanamycin
--	------------------------------------	--

### 2.1.7. Größenstandards

DNA-Größenstandard	<i>Gene Ruler 1kb DNA Ladder</i>	Fermentas
Protein-Größenstandard	<i>PageRuler™ Plus Prestained Proteinladder</i>	Fermentas

### 2.1.8. Oligonukleotide

Eigene RACE-Primer wurden mittels PrimerX und VectorNTI entworfen und von TIB MOLBIOL synthetisiert – ebenso die publizierten RACE-PCR Primer (siehe unten). Informationen zu Antikörpersequenzen wurden unter IMGT (<http://www.imgt.org/>) gefunden. Eigene Mutagenese-Primer wurden von Eurofins MWG Operon hergestellt und phosphorylierte, PTO-gekoppelte Primer von IBA bezogen. StarGate® Sequenzierprimer waren im verwendeten Kit-System vorhanden bzw. wurden bei GATC Biotech (siehe 2.2.14.) nachbestellt. Der pJET1.2/blunt for Primer war bei GATC Biotech bereits im Standard-Sortiment enthalten. Die lyophilisierte DNA wurde in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und vor Gebrauch auf 10µM verdünnt. Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide fanden in dieser Arbeit Verwendung:

*RACE-PCR (halbspezifische Amplifikation mit oligo-A- bzw. oligo-G-Tailing; eigene und publizierte Primer)*

Primer	Sequenz
oligo-T for	(T) <sub>20</sub>
oligo-C for	(C) <sub>20</sub>
IgG1 Hinge rev	5'- CCTGTTGAAGCTCTTGACGA -3'
IgG2b Hinge rev	5'- GGGCATGTAGGGCATTGTG -3'
IgG λ constant 1 rev	5'- CATTCTGCAGGAGACAGACT -3'
IgG λ constant 2 rev	5'- ACACTCAGCACGGGACAAAC -3'
IgG κ constant rev	5'- CCTGTTGAAGCTCTTGACGA -3'
IgG1 CH1 rev*	5'- CGTCATGTGCGACGGATCCAAGCTTGTCCACCATGGAGTTACTTTTGTAG -3'
IgG2b CH1 g rev*	5'- CGTCATGTGCGACGGATCCAAGCTTGTCCACGGTGACTGGCTCAGG -3'
IgG2b CH1 z rev**	5'- CTGAGCTGGTGAGAGTGTAGA G -3'



IgG κ rev**	5'- AGGATGATGTCTTATGAACAA -3'
IgG λ constant rev***	5'- GTATTTGTTGCCCTGTTTGGTG -3'

\*(Gilliland et al. 1996), \*\*(Zhan et al. 2000), \*\*\*(Rintisch et al. 2008)

### Standard-PCR – IBA (spezifische Amplifikation von cDNA)

Primer	Sequenz
V <sub>H</sub> for	5'- (Phosphat) <b>AATGG</b> AGGTKMAGCTGCAGSAGTCWGGGCTGGCYTGG*T -3'
V <sub>H</sub> rev	5'- (Phosphat) <b>TCCCT</b> GAGGACACGGTGACCGTGGTSCCTTGGCCC*C -3'
V <sub>L</sub> κ for	5'- (Phosphat) <b>AATGG</b> ACATTGAGCTCACMCAGWCTCCAKYCTCCCTGKCT*G -3'
V <sub>L</sub> κ rev	5'- (Phosphat) <b>TCCCC</b> CGTTTTTCAGCTCGAGCTTGGTSCCWSCWCCGAACG*T -3'
V <sub>L</sub> λ for (original)	5'- (Phosphat) <b>AATGC</b> AGGCTGAGCTCACTCAGGAATCTGCACTCAC*C -3'
V <sub>L</sub> λ for 2	5'- (Phosphat) <b>AATGC</b> AGTTACAGCTGACTCAACCAA*A -3'
V <sub>L</sub> λ for 3	5'- (Phosphat) <b>AATGC</b> AGGCTGTCCTTACTCAGCCAA*A -3'
V <sub>L</sub> λ rev	5'- (Phosphate) <b>TCCC</b> ACCTAGGACCTCGAGYTTGGTTCCWCCRCCGA*A -3'
	5' Phosphorylierung; <b>AATC/TCCC</b> : combinatorial site; * 3' PTO-Kopplung

### Mutagenese – mFab aCD25

Primer	Sequenz
Y32A (V <sub>L</sub> ) for	5'- GTAATATTGGCAGCGCGTATATGCATTGGTATC -3'
Y32A (V <sub>L</sub> ) rev	5'- CCAATGCATATACGCGCTGCCAATATTACCGC -3'
W35A (V <sub>L</sub> ) for	5'- CTATTATATGCATGCGTATCAGCAGCGGAAGG -3'
W35A (V <sub>L</sub> ) rev	5'- CTTCGCGCTGCTGATACGCATGCATATAATAGC -3'
Y36A (V <sub>L</sub> ) for	5'- CTATTATATGCATTGGGCGCAGCAGCGGAAGG -3'
Y36A (V <sub>L</sub> ) rev	5'- CTTCGCGCTGCTGCGCCCAATGCATATAATAGC -3'
Y94A (V <sub>L</sub> ) for	5'- GTATTTTTGCCATAGCGCGGATGGTCGCATG -3'
Y94A (V <sub>L</sub> ) rev	5'- GCGACCATCCGCGCTATGGCAAAAATACATG -3'
Y107A (V <sub>H</sub> ) for	5'- CCGAATTTGTTGCGTGGGGTCAGGGCAC -3'
Y107A (V <sub>H</sub> ) rev	5'- GCCCTGACCCACGCAACAAATTCGGTG -3'
W108A (V <sub>H</sub> ) for	5'- CCGAATTTGTTTATGCGGGTCAGGGCAC -3'
W108A (V <sub>H</sub> ) rev	5'- GCCCTGACCCGCATAAACAATTCGGTG -3'

## Sequenzierung

Primer	Sequenz
pEntry for	5'- GCGAAACGATCCTCGAAGC -3
pEntry rev	5'- CCCCTGATTCTGTGGATAACCG -3
pFUSE for	5'- GGGAATAAGGGCGACACGG -3
pFUSE rev	5'- GGGAATAAGGGCGACACGG -3
pASG for	5'- GAGTTATTTTACCACTCCCT -3
pASG rev	5'- CGCAGTAGCGGTAAACG -3
pJET1.2/blunt for	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'

### 2.1.9. Vektoren

Folgende Leervektoren und Vektorkonstrukte fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Plasmid	Beschreibung	Marker	Firma
pENTRY-IBA 10	Donorvektor	kanaR; <i>cloning site</i> : XbaI, HindIII; Größe:1775 bp	IBA
pENTRY-IBA 51	Donorvektor	kanaR; T7-Term, Lpp-Term; <i>cloning site</i> : XbaI, HindIII; Größe:1860 bp	IBA
pCFUSE-IBA-hCLK 11	<i>downstream</i> Fusionsvektor mit <i>light chain constant region</i>	ampR; C <sub>L</sub> ; Größe: 1814 bp	IBA
pNFUSE-IBA-shFAB OST 11	<i>upstream</i> Fusionsvektor mit <i>heavy chain constant region + OST</i>	ampR; <i>intergenic region</i> (IR) + <i>Shine Dalgarno</i> (SD); C <sub>H</sub> mit One-STrEP <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> ; Größe: 1833 bp	IBA
pASG-IBA wt2	<i>Acceptor vector</i> für periplasmatische Expression in <i>E.coli</i>	f1 ori; ampR; Tet <sup>R</sup> ; COIEI ori; Tet <sup>P</sup> ; OmpA; <i>expression cassette</i> : XbaI, HindIII; Größe: 3205 bp	IBA
pJET1.2/blunt	Standard Klonierungsvektor	rep (pMB1); ampR; eco47IR; P <sub>lacUV5</sub> ; T7 <sup>P</sup> ; MCS; Größe: 2974 bp	Fermentas

### 2.1.10. Antikörper

Wenn nicht abweichend angegeben handelt es sich bei allen verwendeten Antikörpern um monoklonale anti-Maus Antikörper. Sie wurden für die beschriebenen Experimente bis zur optimalen Verdünnung titriert und eingesetzt.

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3ε purified	145-2C11	BD Pharmingen	1:100
CD3ε APC	145-2C11	eBioscience	1:300
CD3ε PE	145-2C11	BD Pharmingen	1:250
CD4 APC	L3T4	BD Pharmingen	1:250
CD4 Pacific Blue	L3T4	eBioscience	1:100
CD8α APC	5H10	Invitrogen	1:200
CD8α FITC	5H10	Invitrogen	1:200
CD8α Pacific Blue	53-6.7	eBioscience	1:100
CD8α PE	5H10	Invitrogen	1:200
CD19 FITC	1D3	eBioscience	1:100
CD25 APC	PC61	BD Pharmingen	1:100
CD25 PE	PC61	BD Pharmingen	1:100
CD45.1 APC	A20	eBioscience	1:100
CD45.1 FITC	A20	eBioscience	1:100
CD45.1 PB	A20	eBioscience	1:100
CD62L FITC	MEL-14	BD Pharmingen	1:100
CD62L PE	MEL-14	BD Pharmingen	1:100
CD90.1 (Thy1.1) FITC	OX7	BD Pharmingen	1:1000
IFN-γ APC	XMG1.2	eBioscience	1:400
TNF-α PECy7	MP6-XT22	BD Pharmingen	1:100
IL-2 PE	JES6-5H4	BD Pharmingen	1:100
Foxp3 Pacific Blue	FJK-16s	eBioscience	1:100
KI-67 V450 (anti-hu; kreuzreaktiv)	B56	BD Horizon	1:25

### 2.1.11. Fab Streptamere

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, eigens für die Maus entwickelten Fabs wurden analog zu humanen Fab Streptameren mit Strep-Tactin von IBA angesetzt (Stemberger et al. 2012). Verwendet wurden die folgenden Reagenzien:

mFab anti-CD4 mit Strep-Tactin PE/APC  
 mFab anti-CD25 mit Strep-Tactin PE/APC  
 mFab anti-CD62L mit Strep-Tactin PE/APC

#### 2.1.12. Bakterienstämme

Stamm ( <i>E. coli</i> )	Eigenschaften
DH 5 $\alpha$ (Invitrogen)	endA1, hsdR17, (rK-mK+) supE44 THI-1, recA1, gyrA, NalR), relA1, (lacZYA-argF) U169(f80lacZ $\Delta$ M15)
XL10-Gold (Stratagene/ Agilent)	Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ (mcrA)183, $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-(1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10 (Tet <sup>R</sup> ), Amy Cam <sup>R</sup>
JM83 (IBA)	rpsL ara $\Delta$ (lac-proAB) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15

#### 2.1.13. Zelllinien

*Hybridom-Zelllinie PC 61 (rat(B cell); mouse (myeloma)) (ATCC® Nr.: TIB-222™)*

Diese Hybridom-Zelllinie, hergestellt durch die Fusion von B-Zellen der Ratte (*Rattus norvegicus*) und murinen Myelom-Zellen produziert monoklonale IgG1 $\lambda$  Antikörper gegen den murinen IL-2 Rezeptor (CD25). Der produzierte Antikörper gilt als blockierend. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie dazu verwendet RNA für die Generierung eines murinen anti-CD25 Fabs zu Isolieren.

*Hybridom-Zelllinie GK 1.5 (rat(B cell); mouse (myeloma)) (ATCC® Nr.: TIB-207™)*

Diese Hybridom-Zelllinie, hergestellt durch die Fusion von B-Zellen der Ratte (*Rattus norvegicus*) und murinen Myelom-Zellen produziert monoklonale IgG2b $\kappa$  Antikörper gegen murines L3T4 (CD4). Der produzierte Antikörper blockiert spezifisch MHC II T-Helferzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie dazu verwendet RNA für die Generierung eines murinen anti-CD4 Fabs zu isolieren.

#### 2.1.14. Mäuse

Alle Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. RAG<sup>-/-</sup> Mäuse auf dem genetischem Hintergrund von C57BL/6, ursprünglich von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA), wurden unter SOPF Bedingungen *in den Tierställen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gehalten* – ebenso alle verwendete C57BL/6 Mäuse mit congenem Marker CD45.1 (CD90.1) bzw. Thy1.1 und alle DEREK-Mäuse auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 (Lahl and Sparwasser 2011). Für alle Transferexperimente wurden Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen verwendet. Alle Mausexperimente wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt.

### 2.1.15. Software

Folgende Software stand für die Analyse und Auswertung aller durchgeführten Experimente zu Verfügung:

Program m	Her steller
VectorNTI Advance 11	Invitrogen
DNAman V. 6	Lynnon Corp.
ProtParam	<a href="http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam">http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam</a>
PrimerX	<a href="http://www.bioinformatics.org/primerx/">http://www.bioinformatics.org/primerx/</a>
FlowJo	Treestar
Summit V.4.3	Dako
NanoDrop 1000 V 3.7.0	Peqlab
QuantityOne	Biorad
FACS Diva	BD Biosciences
Prism V.5.0a	GraphPad Software
Microsoft Office for OS X	Microsoft

## 2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.1.1. Allgemeines

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction – PCR) ist eine Methode, die es ermöglicht, vorher definierte DNA-Abschnitte *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen ohne auf einen lebenden Organismus angewiesen zu sein. Das Verfahren wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, der hierfür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurde (Saiki et al. 1988). Heute findet die PCR als Standard-Laborverfahren vielfältigste Anwendung insbesondere in der molekularbiologischen Forschung. Die Technik nutzt hierbei die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, Nukleinsäure zu duplizieren, wobei das Enzym nur einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA mit freiem 3'-OH Ende benötigt, von welchem aus eine dem Gegenstrang komplementäre Verlängerung stattfinden kann. Die Spezifität einer Amplifikation wird durch die geeignete Wahl sequenzspezifischer Oligonukleotide, sog. Primer erreicht. Diese binden antiparallel an einen komplementären DNA-Abschnitt und dienen somit der Polymerase als die eben genannten kurzen Doppelstränge mit freien Enden. Die DNA-Polymerase ist Herzstück und Motor der PCR-Reaktion. Daher beeinflusst die Wahl des Enzyms die Qualität des PCR-Produkts

durchaus beträchtlich. Während bei Klonierungsansätzen eine geringe Fehlerrate unerlässlich ist, soll bei spezifischen Amplifikationen z.B. aus cDNA auf hohe Prozessivität geachtet werden. Da in dieser Arbeit durch eine Vielzahl von Anwendungen unterschiedliche Anforderungen an die PCR gestellt wurden, fiel die Wahl auf eine HerculaseII DNA-Polymerase, die sowohl schnell ( $< 30\text{sec}/1\text{kb}$ ) als auch zuverlässig arbeitet und für schwierige Amplifikationen z.B. auf Grund von GC reicher Regionen empfohlen wird. Die solche Amplifikationsreaktion findet in einem Thermocycler (hier T3 und T3000 von Biometra) statt, einem Gerät, welches die Reaktionsgefäße schnell und präzise auf die geforderten Temperaturen eines Zyklus abkühlen bzw. aufheizen kann und zusätzlich über eine Deckelheizung verfügt um Kondensation im Reaktionsraum zu vermeiden. Der Ablauf eines typischen PCR-Programms während einer Amplifikation enthält im wesentlichen immer drei Schritte:

Die **Hitzedenaturierung** der dsDNA Matrize: Diese erfolgt bei  $94 - 96^\circ\text{C}$  um die Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen. Vor dem ersten regulären Zyklus wird in der Regel einmalig für eine längere Dauer erhitzt um sicherzustellen, dass sowohl die komplette Matrize als auch die Primer einzelsträngig vorliegen.

Das **Annealing**: Nach der Denaturierung wird die Temperatur auf ca.  $2 - 3^\circ\text{C}$  unter die Schmelztemperatur der Primer, meist  $48 - 58^\circ\text{C}$ , abgesenkt um eine Primerhybridisierung (*annealing*) mit der ssDNA zu ermöglichen. Dieser Schritt ist essenziell für die Ausbeute und Reinheit des Amplifikats, da eine zu hohe Temperatur eine effektive Primerbindung verhindert, eine zu niedrige Temperatur jedoch zu unspezifischer Hybridisierung und damit unerwünschtem Nebenprodukt führen kann. Eine grobe, doch meist ausreichende Berechnung ermöglicht die Faustformel  $T_M = 2n(A/T) + 4n(G/C)$ . Das Temperaturoptimum für neukonstruierte Primer sollte jedoch stets im Bereich von  $48^\circ\text{C} - 58^\circ\text{C}$  liegen und die Temperaturdifferenz zwischen *forward*- und *reverse*-Primer nicht mehr als  $2^\circ\text{C}$  betragen.

Der **Elongationsschritt**: Hierbei verdoppelt die DNA-Polymerase die ssDNA, wobei sie immer am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnt und den Strang von da aus bis zum 5'-Ende auffüllt. Die Temperatur hängt vom gewählten Enzym ab. Dieses muss thermostabil sein, wie z.B. es die „Ur“-Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* ist. In der Regel läuft dieser Schritt bei  $69 - 72^\circ\text{C}$  ab. Die Elongationszeit hängt ebenfalls von der Polymerase und natürlich von der Länge des DNA-Fragments ab und lässt sich aus beidem errechnen.

Ein typisches, in dieser Arbeit verwendetes PCR-Programm lautete folgendermaßen:

1.	Initiale Denaturierung	$94^\circ\text{C}$	2 min
2.	Denaturierung	$94^\circ\text{C}$	1 min
3.	Annealing	$48 - 58^\circ\text{C}$	1 min
4.	Elongation	$68 - 72^\circ\text{C}$	1 min
5.	Nachsynthese	$68 - 72^\circ\text{C}$	5 min
6.	Lagerung	$4^\circ\text{C}$	$\infty$

Die Schritte 2 bis 4 wurden dabei je nach Versuchsanforderung und zu erwartender Effizienz 28 – 38 mal wiederholt. Ein typischer Reaktionsansatz (hier für die HerculaseII DNA-Polymerase) setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl	5x HerculaseII Reaktionspuffer	
100 ng	Matrizen-DNA	
2,5 µl	<i>forward</i> -Primer	(10 µM)
2,5 µl	<i>reverse</i> -Primer	(10 µM)
0,5 µl	dNTP-Mix	(100 mM)
1 µl	HerculaseII	(1 U/µl)
Σ50 µl	H <sub>2</sub> O bidest.	

Die entstandene DNA verdoppelt sich mit jedem Zyklus, was zu einem exponentiellen Anstieg der gewünschten Ziel-DNA führt. Die Anzahl der entstehenden Nebenprodukte aus dem ersten Zyklus steigt daneben nur linear an, kann also schon nach wenigen Zyklen vernachlässigt werden.

#### 2.2.1.2. Mutagenese PCR

Möchte man eine spezifische DNA-Sequenz nicht einfach nur vervielfältigen, sondern dabei auch noch kontrolliert verändern, bietet die PCR eine elegante Methode um Mutationen in die zu amplifizierende Zielsequenz einzuführen. So kann eine Punktmutation eingebaut werden, wenn der verwendete Primer die eine nicht-komplementäre Base trägt und nur lang genug ist, damit beidseits der „falschen“ Base genügend komplementäre Sequenz für eine stabile Hybridisierung vorhanden bleibt. In dieser Arbeit wurde auf die Mutagenese-PCR vertraut um gezielt kleine Veränderungen in der Sequenz der hergestellten murinen Fabs einzubringen. Bei den DNA-Matrizen handelte es sich um bereits klonierte, in Plasmiden befindliche DNA, so dass eine Amplifikation nach dem Prinzip einer inversen PCR durchgeführt werden konnte. Mit nur einem Primer-Paar wurde somit die komplette Vektorsequenz zirkulär amplifiziert. Die eigens entworfenen, von MWG synthetisierten Mutagenese-Primer umspannten die zu mutierende Position beidseitig um jeweils ca. 20 bp. Die Schmelztemperatur der beiden Bereiche wich nicht mehr als 2°C ab.

Ein typischer Reaktionsansatz lautete:

5 µl	5x HerculaseII Reaktionspuffer	
100 ng	Matrizen-DNA	
1 µl	<i>forward</i> -Primer	(10 µM)
1 µl	<i>reverse</i> -Primer	(10 µM)

0,5 µl	dNTP-Mix	(100 µM)
1 µl	HerculaseII	(1 U/µl)
Σ50 µl	H <sub>2</sub> O bidest.	

Nachfolgende Programmierung wurde für den Thermocycler vorgenommen:

1.	Initiale Denaturierung	95°C	2 min
2.	Denaturierung	95°C	1 min
3.	Annealing	48 – 58°C	45 sec
4.	Elongation	68 – 72°C	1 min/ kb
5.	Nachsynthese	68 – 72°C	3 min
6.	Lagerung	4°C	

### 2.2.1.3. Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription konnte nach Zellaufschluss der Hybridome und Phenol/Chloroformextraktion aus isolierter Total-RNA (siehe 2.2.4) relativ schnell und spezifisch mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden um diese somit für das weitere Vorgehen verfügbar zu haben. Bei der Methode wird die Fähigkeit eines ursprünglich viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (RT) nutzbar gemacht, welche RNA in cDNA zu transkribieren vermag. Im ersten Schritt wurde hierzu die isolierte Total-RNA mit einem oligo-T Primer inkubiert, welcher an poly-A-Schwänze der mRNA bindet und der Reversen Transkriptase in der Folge als Primer dient.

Ein typisches Protokoll lautete:

10 µl	RNA		Thermocycler	
5 µl	Oligo dT <sub>20</sub>	100µM	65°C	5 min
Σ13,2 µl	H <sub>2</sub> O bidest.		Raumtemperatur	10 min

Die hierbei verwendete RNA stammte entweder unmittelbar aus Prozessierung der Hybridom-Zellen (siehe 2.2.4.) oder aus der Lagerung bei -80°C. Im zweiten Fall wurde ein Aliquot bei Bedarf nur kurz angetaut um die entsprechende Menge für einen Ansatz zu entnehmen. Im Anschluss erfolgte die eigentliche Transkription unter Verwendung des entsprechenden Kits von Stratagene/ Agilent (siehe 2.1.3):

2 µl	10x RT Puffer		Thermocycler	
2 µl	DTT	100 mM	50°C	1 h
0,8 µl	dNTPs	100 mM	70°C	15 min
1 µl	AffinityScript RT	1 U/ µl		



1 µl	RNase Inhibitor	40 U/ µl
Σ6,8 µl		

Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert und für die verschiedenen hier erläuterten PCR-Methoden verwendet.

#### 2.2.1.4. RACE-PCR für die halbspezifische Amplifikation von cDNA

Eine wichtige Voraussetzung für das prinzipielle Funktionieren einer klassischen PCR ist das Wissen um zumindest zwei kurze Sequenzbereiche, welche das gewünschte DNA-Fragment flankieren und dem Primer-Paar als Bindestellen dienen können. Kennt man nur einen oder gar keinen flankierenden Sequenzabschnitt, ist eine spezifische Amplifikation in ihrer ursprünglichen Form nicht möglich. Allerdings gibt es einen eleganten Weg das Problem zu umgehen und auch halbspezifisch zu amplifizieren. Hierbei ist nur ein spezifischer Primer nötig, welcher die gewünschte Sequenz an bekannter Flanke bindet und der Polymerase einen Startpunkt bietet. Am anderen Ende der Sequenz hingegen bindet nur ein unspezifischer repetitiver oligo-T oder -C Primer an einen komplementären poly-A oder -G-Schwanz. Damit hat die Polymerase nun die Möglichkeit vom unbekanntem Ende der Sequenz in Richtung der spezifischen Seite arbeiten zu können. Dieses Prinzip erfordert jedoch zuvor eine Erweiterung der DNA-Matrize um die erwähnte Polynukleotid-Kette. Dies geschieht vor der PCR im sog. *Tailing*, bei dem das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) die cDNA an ihrem 3' Ende um eine Kette identischer Nukleotide erweitert ohne hierfür einen Primer zu benötigen. Diese Erweiterung dient schließlich einem oligo-T oder -C Primer als komplementäre Bindestelle und ist somit die zweite bekannte flankierende Sequenz, welche für den klassischen PCR Schritt notwendig ist. In der vorliegenden Arbeit fand diese Methode ihre Anwendung bei dem Versuch, die unbekannt Sequenz der variablen Regionen aus den produzierten Antikörpern beider Hybridom-Zelllinien zu isolieren, indem aus der bekannten konstanten Region in Richtung der unbekannt amplifiziert wurde.

Ein typischerweise verwendetes Protokoll, hier für ein poly-G *Tailing*, lautete:

1 µl	MgCl <sub>2</sub>	40 mM	Thermocycler	
1 µl	DTT	100 mM	37°C	1 h
1 µl	dGTPs	2 mM	70°C	15 min
0,5 µl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM		
0,8 µl	TdT	30 U/µl		
Σ9,8 µl	H <sub>2</sub> O bidest			

Es folgte eine Standard-PCR mittels HerculaseII DNA-Polymerase (siehe 2.2.1.1.). Die Produkte aller genannten PCR-Reaktionen können anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert werden.

### 2.2.2. Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine vielfach genutzte Variante gelelektrophoretischer Auftrennungstechniken, die speziell zur Auftrennung von Nukleinsäuren gedacht ist. Diese werden hier, auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen ausschließlich nach Größe aufgetrennt. Dabei dient Agarose als Matrix, da die Poren eines solchen Gels gröber sind (150 nm bei 1%igem Gel) als bei vergleichbaren Polyacrylamidgelen (3 – 6 nm), was sich besonders für die Auftrennung der verhältnismäßig großen Nukleinsäuremoleküle eignet. Auf Grund des Molekularsieveeffekts solcher Gele ist der Agarose-Anteil entscheidend für Auflösung, Laufgeschwindigkeit und das gesamte Auftrennergebnis eines Laufs. In dieser Arbeit wurde standardmäßig 1% Agarose-Lösung in TAE Puffer hergestellt, in einer Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 300 µg/l) versetzt. Das noch flüssige Gel wurde abschließend zügig in eine horizontale Gelkammer gegossen, wobei auf die Vermeidung von Luftblasen im Gel geachtet wurde. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die DNA-Proben mit 6x DNA Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen (maximales Endvolumen 25 µl). Ein Gel-Lauf dauerte bei einer Spannung von 130 V (Feldstärke: 10 V/cm) ca. 30 min. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE verwendet. Die Detektion aufgetrennter Proben erfolgte unter UV-Licht (245 nm), welches in die DNA interkaliertes fluoreszentes Ethidiumbromid und damit das Bandenmuster sichtbar macht. Die Gele wurden mit Hilfe einer Gel-Dokumentationsstation analysiert und fotografiert. Als Referenz für die Auswertung der aufgetrennten Banden diente ein 1kb-DNA-Größenstandard.

### 2.2.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Wie oben erläutert können PCR-Produkten oder auch mittels Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektoren durch Auftrennung im Agarose-Gel vereinzelt und als distinkte Banden sichtbar gemacht werden. Um mit diesen getrennten und gleichsam sortierten DNA-Fragmenten weiterarbeiten zu können, müssen die genannten Banden aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt werden. Hierzu wurden die Nukleinsäuren nach erfolgreichem Gel-Lauf unter intensitätsreduziertem UV-Licht (um das Risiko von Mutationen in den Fragmenten zu minimieren) mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mittels Gel-Extraktionskit (Quiagen, Peqlab – siehe 2.1.4.) gemäß Protokoll von Gel-, Salz-, Protein- oder DMSO-Rückständen befreit und aufgereinigt.

### 2.2.4. RNA-Isolierung aus Zelllysaten

Den ersten Schritt zur Identifizierung der gesuchten Fab-Sequenzen bildete die RNA-Isolierung aus Lysaten der beiden Hymbridom-Zelllinien GK1.5 und PC61 nach dem Prinzip einer Phenol/Chloroformextraktion. Hierfür wurde das Kulturmedium als erstes dekantiert und das

Zellsediment mit 0,2 ml/1x10<sup>6</sup> Zellen TRI-Reagent® (Sigma) versetzt. Die Zellen wurden im Phenol- und Thiocyanat-haltigen Reagenz resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde 1/5x Volumen Chloroform zugegeben, das Homogenat 15 sec mittels Vortexer geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) wurde mit der oberen, klaren, wässrigen Phase die RNA zur Weiterbehandlung abgenommen. SO isolierte RNA wurde nun durch Zugabe von 1x Volumen Isopropanol während 10 min Inkubation bei Raumtemperatur präzipitiert und danach zentrifugiert (12000 g, 12 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das weißliche RNA-Pellet mit 0,5 ml 75% Ethanol gewaschen, mittels Vortexer geschüttelt und abschließend zentrifugiert (812000 g, 8 min, 4°C). Im letzten Schritt wurde das Pellet 3 – 5 min luftgetrocknet und in 20 µl HPLC-Wasser gelöst. Folgte nicht unmittelbar 2.2.1.2., wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 2.2.5. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Um für Sequenzieraufträge, Ligationsansätze oder weitere Klonierungsschritte sagen zu können, welche Menge an DNA amplifiziert und aus einem Gel extrahiert werden konnte, musste eine DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Diese wurde spektralphotometrisch durch ein NanoDrop® Messgerät (siehe 2.1.1.) bestimmt. Das Gerät misst die Extinktion der Probe bei 260 nm und berechnet daraus die Konzentration in µg/ml. Proteinverunreinigungen, welche die Messung beeinflussen werden über den Absorptionsquotienten A<sub>260 nm</sub>/ A<sub>280 nm</sub> erfasst, wobei eine Quotient um 1,8 als optimal gilt. Kleinere Werte sind ein Hinweis auf Proteinverunreinigungen, größere hingegen auf Kontamination mit RNA, bestimmter Salze oder eine zu basische Lösung.

### 2.2.6. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche die Fähigkeit besitzen DNA an einer bestimmten Stelle zu erkennen und in der Folge zu zerschneiden. Grundsätzlich unterscheidet man drei Klassen dieser Enzyme, wobei jedoch Typ I und III willkürlich oder in sehr weiter Entfernung der Erkennungssequenz arbeiten. Typ II jedoch schneidet innerhalb der vom ihm erfassten, meist palindromischen Erkennungssequenz, ist daher hochspezifisch und für die Molekularbiologie von größtem Nutzen. Diese palindromischen Zielsequenzen sind meist vier, sechs oder acht bp lang und bieten je nach Enzym die Möglichkeit zu einem glatten Schnitt (*blunt ends*) oder einem versetzten Schneiden, welches Basenpaarüberhänge, sog. klebrige Enden (*sticky ends*) zurücklässt. Diese Enden können an andere Fragmente mit passenden, komplementären Überhängen binden. Da in dieser Arbeit für Klonierungen aber Kits verwendet wurden, die ihrerseits mit dem Prinzip der *blunt end*-Klonierung arbeiten und sonstiger Restriktionsverdau nur zu Analysezwecken nach PCR oder Klonierung

durchgeführt wurde, spielte hier die Auswahl der Enzyme in Bezug auf *blunt* oder *sticky* keine größere Rolle.

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangabe (Fermentas) mit dem zugehörigen Originalpuffer angesetzt und für 1h bei 37°C mit der Probe inkubiert. Der Reaktionsansatz lautete:

2 µl	10x Reaktionspuffer	
5 µl	DNA	
0,5 µl	5'-Restriktionsenzym	(10 U/µl)
0,5 µl	3'-Restriktionsenzym	(10 U/µl)
Σ20 µl	H <sub>2</sub> O bidest.	

Daneben wurde der einfache Restriktionsverdau zur Verifizierung eines erfolgreich in einen Vektor klonierten DNA-Fragments (v.a. im Zuge der Fab-Klonierung im StarGate®-System) mit Hilfe schnell arbeitender FastDigest® Enzyme (Fermentas) im zugehörigen Puffer, mit enthaltenem Ladepuffer für die gelelektrophoretische Auftrennung, durchgeführt. Hierbei erforderte die Inkubation nur 5 bis 15 min.

Das zugehörige Protokoll lautete hier:

2 µl	10x Reaktionspuffer	
5 µl	DNA	
1 µl	5'-Restriktionsenzym	
1 µl	3'-Restriktionsenzym	
Σ20 µl	H <sub>2</sub> O bidest.	

### 2.2.7. Dpn1-Verdau

Nach durchgeführter Mutagenese-PCR (siehe 2.2.1.2.) ist es, so denn es sich um klonierte DNA handelt, erforderlich methylierte Plasmid-DNA zu degradieren um das mutierte DNA-Fragment isoliert und für die weitere Verwendung (Transformation in Bakterien) aufgereinigt zu Verfügung zu haben. Hierzu wurden die Produkte der Mutagenese-PCR mit 1 µl des Restriktionsenzym Dpn1 (10 U/µl) versetzt, welches DNA in Abhängigkeit ihres Methylierungsstatus schneidet. So bleibt die unmethylierte mittels PCR synthetisierte DNA unangetastet, während die methylierte bakterielle Plasmid-DNA abgebaut wird. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und weiterverarbeitet oder über Nacht bei -20°C gelagert.

### 2.2.8. Ethanol-Präzipitation

Zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA bietet sich die einfach durchzuführende Ethanol-Fällung an, welche durch Alkohol und Aussalzen eine Präzipitation der DNA herbeiführt. Die Methode

wurde hier in der Regel im Anschluss an den Dpn1 Verdau mutierter PCR-Produkte und vor deren Transformation durchgeführt. Die Nukleinsäure wurde hierzu mit 2,5x Volumen 99,8% Ethanol und 1/10x Volumen 3M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) versetzt. Die Ausfällung erfolgte während 1 h bei -20°C oder über Nacht bei -80°C. Nach anschließender Zentrifugation (13000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einer abschließenden Trocknung bei 55°C im Thermoblock konnte die DNA in H<sub>2</sub>O bidest gelöst werden.

### 2.2.9. Hitzeschocktransformation

Die Hitzeschocktransformation ist ein bewährtes Standard-Verfahren um DNA in chemisch-kompetente Bakterien einzubringen. Sie wird an dieser Stelle beschrieben, da sie wichtiger Bestandteil vieler Klonierungsverfahren ist, und daher in vielen der nachfolgend erläuterten Methoden oft zur Anwendung kam. Für verschiedene noch folgende Klonierungstechniken wurde eine einheitliche, im Labor etablierte Hitzeschocktransformation durchgeführt. Hierbei wurden 25 µl chemisch kompetenter Bakterien (*E. coli* – DH5α oder XL10-Gold; siehe 2.1.12.) mit 10 – 100 ng DNA (Maximalvolumen 5 µl) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 45 sec bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und 2 min auf Eis abgekühlt. Schließlich wurde der Mix mit 1 ml 37°C-warmem LB<sub>0</sub>-Medium versetzt und für 1 h unter konstantem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (13000 g, 1 min) wurden 800 µl des Überstands abgenommen und das Zellpellet im verbleibenden Medium (100 – 200 µl) resuspendiert. Diese aufkonzentrierte Suspension wurde schließlich auf entsprechendem Selektionsmedium (LB<sub>Amp</sub><sup>-</sup>, LB<sub>Kana</sub>-Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.10. Elektrotransformation

Alternativ zum obigen Verfahren kann eine Transformation von DNA in Bakterien auch mit Hilfe elektrischen Stroms erfolgen. Durch kurzzeitiges Anlegen eines starken elektrischen Feldes ändern sich die Membraneigenschaften der Zelle und für einen Augenblick bilden sich Mikroporen, durch die DNA in die Bakterien gelangt. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit während der letzten Schritte im StarGate®-System benutzt um das fusionierte Fab-Konstrukt im finalen Expressionsvektor in die Bakterien einzubringen. Hierzu wurden 40 µl elektrokompetenter Bakterien (*E. coli* – JM83) mit 10 µl aufgereinigter Plamid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einer gekühlten Quarzküvette im Elektroporator (Gene Pulser, siehe 2.1.1.) einem kurzen Strompuls (2,5kV, 25µF, 400Ω) ausgesetzt und anschließend sofort in 1 ml warmen LB<sub>0</sub>-Medium resuspendiert. Das weitere Vorgehen der Vorinkubation und Ausplattierung deckt sich mit 2.2.9..

### 2.2.11. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die hier verwendete, gängige und als Kit verfügbare Methode der Plasmid-Isolation beruht auf dem Prinzip alkalischer Lyse und einer selektiven Adsorption von DNA auf Silica-Gel Membranen unter Hochsalzbedingungen. So kann nach Trennung der DNA von Kontamination durch Proteine, RNA, Metabolite etc. im Zuge aufeinanderfolgender Waschschriffe am Ende eine Elution unter Niedersalzbedingungen erfolgen. Für diese sog. Minipräparation wurden entsprechende Kits von Qiagen und Promega herangezogen (siehe 2.1.4.). Einzelne Kolonien nach Transformation ausplattierter Bakterien (siehe oben) wurden mittels Pipettenspitze von der Platte isoliert, in 3 ml LB<sub>Amp</sub><sup>-</sup> oder LB<sub>Kana</sub><sup>-</sup> Medium überführt und über Nacht unter konstantem Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. In Folge wurden 2 ml der Zellsuspension zentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT) und dem Herstellerprotokoll entsprechend aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 50 µl H<sub>2</sub>O bidest.

### 2.2.12. CloneJET™ Klonierung

Für eine robuste Klonierung von PCR-Produkten, welche mittels pfu-Polymerase bzw. der hier verwendeten HerculaseII DNA-Polymerase generiert wurden, bietet sich ein einfaches *blunt-end* Verfahren an, da die genannten Enzyme während der PCR Amplifikate mit glatten Enden produzieren, was eine schnelle Ligation in den Vektor ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu ein CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) benutzt, um im Zuge der murinen Fab-Generierung amplifizierte PCR-Produkte für Sequenzanalysen, weitere Vermehrung in Bakterien oder zur stabilen Lagerung in Plasmide einzubringen. Das Kit-System arbeitet mit dem pJET1.2/blunt Vektor, welcher DNA-Fragmente bis zu 10 kb fasst, einen T7 Promotor beinhaltet und ein Lethalitätsgen besitzt, das bei korrekter Insertion zerstört wird und in Kombination mit einer Ampicillinresistenz selektiv das Überleben des Wirtsbakteriums ermöglicht. Der Ligationsansatz der *blunt-end* Klonierung setzte sich gemäß Herstellerangaben wie folgt zusammen:

10 µl	2x Reaktionspuffer
1 µl	PCR Produkt
0,5 µl	pJET1.2/blunt Cloning Vektor (50 ng/µl)
1 µl	T4 DNA Ligase
Σ20 µl	H <sub>2</sub> O Nuklease-frei

Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur ligiert und anschließend über Hitzeschocktransformation (siehe 2.2.9.) in *E.coli* - DH5α eingebracht.

### 2.2.13. StarGate® Klonierung

Die Herstellung monomerer Fab-Fragmente aus monoklonalen Antikörpern erforderte nicht nur die bereits beschriebenen Schritte der RNA-Isolierung aus Hybridom-Zellen und der spezifischen Amplifikation variabler Regionen von schwerer ( $V_H$ ) und leichter Kette ( $V_L$ ), sondern in der Folge auch die Fusion der einzelnen Bestandteile eines Fabs, dessen Konjugation mit einem One-STrEP *Strep*-tag® am Carboxy-Terminus der schweren Kette und die Expression des gesamten Konstrukts. Alle Klonierungsschritte auf dem Weg zu einem funktionellen Reagenz wurden mit Hilfe des StarGate® Combinatorial Cloning Kits durchgeführt. Dieses mit einer Vielzahl verschiedener Expressionssysteme modular aufgebaute Klonierungssystem bietet nicht nur die Möglichkeit Fusionsklonierungen einfach durchzuführen, sondern hat insbesondere den Vorteil, konstante Regionen humaner oder muriner Fab-Fragmente sowie den *Strep*-tag bereits in Plasmiden integriert anzubieten. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Klonierung mit StarGate® ist die Amplifikation der gewünschten DNA (GOI – *gene of interest*) mit Primern, die eine 3' Phosphorothioat (PTO) Kopplung zum Schutz gegen die Exonuklease-Aktivität von pfu-Polymerasen und eine 5' *combinatorial site* besitzen. Dieser 4 bp kurze Sequenzabschnitt dient während der Rekombination einer Rekombinase als Bindestellen und ermöglicht unidirektionale effiziente Reaktionen und die Insertion des GOI in korrekter Orientierung. Da die Amplifikation der variablen Regionen mit genannten Primern durchgeführt wurde (siehe 2.1.8. und 2.2.1.1.), bestand das nächste Ziel darin diese amplifzierten variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L \kappa$  bzw.  $V_L \lambda$  mit den bereits vorhandenen konstanten Regionen der schweren ( $C_H$  + One-STrEP *Strep*-tag®) und leichten Kette ( $C_L$ ) zu fusionieren und in Expression zu bringen. Hierzu wurden gemäß Herstellerprotokoll als erstes die Amplifikate von  $V_H$  und  $V_L \kappa$  bzw.  $V_L \lambda$  jeweils in den sog. Donorvektor (pEntry-IBA 51) kloniert. Im Anschluss folgte eine Fusionsklonierung 1. Ordnung von  $V_L$  aus dem Donorvektor in den Fusionsvektor pCFUSE-IBA-hCLK 11, welcher  $C_L$  enthielt und parallel dazu die analoge Übertragung von  $V_H$  aus dem Donorvektor in den pNFUSE-IBA-shFAB OST 11, der  $C_H$  + One-STrEP *Strep*-tag® beinhaltete. In der Fusionsklonierung 2. Ordnung wurden nun die beiden Konstrukte ( $V_L + C_L$ ) und ( $V_H + C_H +$  One-STrEP *Strep*-tag®) in einem neuen Donorvektor zusammengeführt. Abschließend erfolgte die Klonierung der Bestandteile in den sog. *acceptor vector*, einen Expressionsvektor für *E.coli* (pASG-IBA wt2). Dieser enthielt jetzt das komplette Konstrukt in der Orientierung 5' -  $V_H$  -  $C_H$  - *Strep*-tag – SD -  $V_L$  -  $C_L$  – 3'. Es folgte eine Elektrotransformation (siehe 2.2.10.) des Vektors in *E.coli* (Stamm: JM83) und die periplasmatische Proteinexpression des Fab-One-STrEP *Strep*-tag® Fusionsproteins (siehe 2.4.2.).

### 2.2.14. DNA-Sequenzierung, DNA-Synthese, Sequenzanalyse

Sequenzierreaktionen von PCR-Produkten oder subklonierter DNA wurden bei GATC Biotech, Konstanz, in Auftrag gegeben. Die in einem Fall notwendige Synthese eines Fab-Konstrukts erfolgte

durch die Firma GeneArt (Invitrogen), Regensburg. Analyse und vergleichende Alignments sequenzierter DNA wurden mit Hilfe der Programme VectorNTI und DNAMAN (2.1.15.) durchgeführt.

## 2.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

### 2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung und Analyse eines Proteingemisches kann standardmäßig denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel verwendet werden. Kernpunkt ist hierbei das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), welches proportional zur molaren Masse von Proteinen (ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) an selbige bindet, was eine Dissoziation, Entfaltung und Lösung selbst komplexer Proteinmoleküle möglich macht. Die Auftrennung erfolgt wie bei Elektrophoresen üblich während der Wanderung der Probe durch ein als Molekularsieb fungierendes Gel, woran ein elektrisches Feld angelegt ist. In diesem speziellen Fall wandern die von negativ geladenem SDS umgebenen Proteine, deren Eigenladungen nun keine Rolle mehr spielen in Richtung Anode. Auf Grund ihrer größenbedingt unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten kommen sie entlang ihres Molekulargewichts aufgetrennt zum Liegen. Die in dieser Arbeit angewandte Methode nach *Laemmli* arbeitet mit einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel, welches sich aus unterem Trenngel (Polyacrylamid-Konzentration verschieden) und oberem Sammelgel (2% Polyacrylamid) zusammensetzt.

Die Zusammensetzung der Gele lautet wie folgt:

#### *Sammelgel:*

2% (w/v)	Acrylamid 30% (29:1)
0,125 M	Tris-HCl (pH 6,8)
0,25% (w/v)	SDS

#### *Trenngel:*

7 - 15% (w/v)	Acrylamid 30% (29:1)
3,75 M	Tris-HCl (pH 8,8)
0,1%	SDS

Zum Polymerisationsstart wurden jeweils 5 µl TEMED und 25 µl (Sammelgel) bzw. 50 µl (Trenngel) 10% APS in H<sub>2</sub>O bidest. zugegeben. Das Trenngel wurde nach Polymerisationsstart in eine Vertikalkammer (1,0 mm Dicke, 5 cm Laufstrecke; Biotech; siehe 2.1.1.) gegossen und zur Ausbildung



einer geraden Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Polyacrylamids (ca. 30min) wurde das Isopropanol entfernt und stattdessen das Sammelgel luftblasenfrei überschichtet und abschließend ein Taschenkamm eingesetzt. Das fertig polymerisierte Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer (Hofer; siehe 2.1.1.) eingesetzt und durch Befüllen mit *Laemmli*-Laufpuffer (siehe 2.1.5.3.) eine Verbindung zu Anode und Kathode hergestellt.

Das aufzutrennende Protein wurde vor dem Auftragen in 5x Auftragspuffer (siehe 2.1.5.3.) gelöst und 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Nach Zentrifugation (13000g, 20 sec) wurden die Geltaschen des Sammelgels vorsichtig mit den Überständen der Proben beladen. Für die Passage des Sammelgels wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Bei Eintritt in das Trenngel wurde diese auf 120 V erhöht. Als mitlaufender Längenstandard diente der *Precision Plus Prestained Marker* (Fermentas). Beendet wurde die Elektrophorese, sobald eine gewünschte Auftrennung des Längenstandards gegeben war.

### 2.3.2. Western Blot

Um eine mittels SDS-PAGE aufgetrennte Probe weiter zu analysieren und z.B. nur ganz bestimmte Proteine sichtbar zu machen, kann das Bandenmuster nach Auftrennung im sog. Western Blot elektrophoretisch übertragen werden. Der Nachweis eines speziellen Proteins kann im Anschluss mittels spezifischer Antikörper (Immuno-Blot) äußerst sensitiv erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik zusammen mit SDS-PAGE verwendet um Ausbeute und Reinheit einer erfolgreichen Proteinexpression muriner Fabs näher zu analysieren. Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach vollendeter SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und ein Stück Nitrozellulosemembran sowie 6 Stück Whatman Papier gemäß der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und für kurze Zeit in Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer *semi-dry-blot*-Apparatur (BioRad; siehe 2.1.1.). Drei in Transferpuffer getränkte Whatman Papierfilter wurden in der Apparatur genau übereinander positioniert und darauf in dieser Reihenfolge getränkte Nitrozellulose, das Gel und drei weitere nasse Whatman Papierfilter gelegt. Der Transfer erfolgte nun durch Anlegen einer Stromstärke von 1,2 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche (64 mA/ Gel). Die Blot-Zeit variierte, wie bei dieser Technik üblich, in Abhängigkeit von der Größe der zu übertragenden Proteine zwischen 50 min und 2 h. Nach Beendigung des Blot-Vorgangs wurde die Membran für mindestens 1 h bei 4°C in Blocking-Lösung inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Daraufhin folgte eine Übernacht-Inkubation mit dem anti-One-STrEP *Strep*-tag Primärantikörper (*Strep*MAB, IBA; nach Herstellerprotokoll verdünnt zugegeben) bei 4°C. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran 3x à 10 min in 1x PBT gewaschen. Dieser mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper wurde nach Verdünnung (1:5000) nun mindestens 1 h bei 4°C mit der Membran inkubiert. Es folgten vier Waschschrte à 5 min in 1x PBT sowie zwei Waschschrte à 5 min in PBS bevor die Membran für 1 min dem Substrat der

Peroxidase, ECL Plus Reagenz (Perkin Elmer) ausgesetzt und nach kurzem Antrocknen bei Dunkelheit auf einen Röntgenfilm (Fujifilm; siehe 2.1.1.) gelegt wurde. Die Belichtungszeiten wurden in Abhängigkeit der Signalstärke gewählt. Das Prinzip der hier angewandten ECL-Methode ("*enhanced chemiluminescence*") beruht auf der Kopplung eines sekundären Antikörpers mit Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP). Hierbei katalysiert das Enzym die Oxidation eines Stoffes namens Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) mittels  $H_2O_2$  zu 5- Aminophtalsäure. Die dabei freiwerdende Energie wird als Licht emittiert (Chemolumineszenz) und führt so zu einer lokalen Belichtung des Films. Alle beschriebenen Inkubations- und Waschschrte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur.

### 2.3.3. Silberfärbung

Während Western /Immuno-Blot Verfahren die Möglichkeit bieten ganz bestimmte Proteine oder Proteinbestandteile in einer mittels SDS-PAGE aufgetrennten Probe sichtbar zu machen, können alternativ dazu durch eine Silberfärbung alle Proteine einer aufgetrennten Probe gleichzeitig und mit höherer Sensitivität (bis zu 0,1 ng/ Bande) dargestellt werden. In der vorgelegten Arbeit wurde diese Technik benutzt um die exprimierten Fabs zusätzlich zu der oben beschriebenen Western Blot Analyse weiter auf Kontamination hin zu untersuchen. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel aus einer SDS-PAGE gemäß folgenden Protokolls fixiert, gefärbt und entwickelt:

Die Fixierung des Gels begann durch Inkubation in Lösung A (Ethanol und Essigsäure) für 30 min unter permanentem Schütteln auf einem Orbitalschüttler (siehe 2.1.1). Als nächstes wurde Lösung A durch B ausgetauscht und das Gel für weitere 15 min unter Schütteln inkubiert. Hierbei werden die Proteine durch Denaturierung im Gel immobilisiert und ausgefällt. Es folgten sukzessive fünf Waschschrte mit  $H_2O$  bidest à 5 min, ein Inkubationsschritt in Lösung C (Fixiersalz) für 1 min und erneute Waschschrte (2x à 1 min) in  $H_2O$  bidest. Die anschließende Färbung mit Silbernitrat (Lösung D), zur Anlagerung der Silberionen an Proteine, wurde für 25 min inkubiert und das Gel danach erneut in zwei Waschrten à 1 min von überschüssiger Färbelösung befreit. Die Entwicklung des Gels folgte durch Inkubation in Lösung E, wobei hier in der Lösung enthaltenes Formaldehyd die Silberionen zu elementarem Silber reduziert und somit zur Anfärbung der Proteinbanden führt. Bei diesem Schritt musste, wie bei der Entwicklung einer Fotografie, auf die Entwicklungsdauer geachtet werden, welche in Abhängigkeit der Signalstärke, unterschiedlich lang dauern kann (in der Regel unter 10min). Erste Verfärbungen des Gels und das Auftauchen der silbrig-braunen Proteinbanden begann bereits nach 1 bis 2 min. Gestoppt wurde dieser Entwicklerschritt nach Erreichen der gewünschten Farbintensität mittels EDTA-haltigen Lösung F. Die einzelnen Lösungen wurden für jeden Ansatz in einem Volumen von 200 ml frisch hergestellt und strikt gekühlt verwendet.

L ö s u n g			Vol: 200 ml	A r b e i t s s c h r i t t	
1.	A	50% Methanol 5% Essigsäure		Fixierung	30 min
2.	B	50% Methanol		Inkubation	15 min
3.		milli-Q H <sub>2</sub> O		5x Waschen à	5 min
4.	C	Natriumthiosulfat	0,2 g/l	Inkubation	1 min
5.		milli-Q H <sub>2</sub> O		2x Waschen à	1 min
6.	D	Silbernitrat	0,2 g/100ml	Inkubation	25 min
7.		milli-Q H <sub>2</sub> O		2x Waschen à	1 min
8.	E	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhydr. 37% HCOH	3 g/100ml 25 µl/100ml	Entwicklung	max. 10 min
9.	F	Na <sub>2</sub> -EDTA	14 g/l	Entwicklungsstopp	10 min
10.		milli-Q H <sub>2</sub> O		2x Waschen à	1 min

## 2.4. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.4.1. Kultivierung der Hybridom-Zelllinien PC61 und GK1.5

In flüssigem Stickstoff gelagerte 1 ml Aliquots der Hybridom-Zellen wurde im Wasserbad schnell bis knapp über den Gefrierpunkt erwärmt, in kaltem Medium aufgenommen, gewaschen und zentrifugiert um somit im Gefriermedium enthaltenes DMSO möglichst schnell zu verdünnen und von den Zellen zu trennen. Anschließend wurden dieselben in 20 ml warmem RP10<sup>+</sup>-Medium (siehe 2.1.6.) resuspendiert und in Kulturflaschen bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Zum Einfrieren wurde die Zellkultur abzentrifugiert, in kaltem RP10<sup>+</sup>-Medium aufgenommen, gezählt und nach wiederholter Zentrifugation in 0,5 ml Einfriermedium/ 1x10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert. In 1 ml Cryo-Röhrchen aliquotiert wurden die Zellen schließlich im *Freezing container* (siehe 2.1.1.) auf -70°C herabgekühlt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur RNA-Isolierung wurden die Kultur in 50 ml Röhrchen überführt, abzentrifugiert und gemäß 2.2.4. weiterbehandelt.

### 2.4.2. Proteinexpression

Nach erfolgreicher Klonierung der Fab-Fragmente in den finalen Expressionsvektor (*Acceptor vector* pASG-IBA wt2; siehe 2.1.9.; beinhaltet eingebrachte *constant heavy chain* ( $C_H$ ) mit One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup>, *constant light chain* ( $C_L$ ), *variable heavy chain* ( $V_H$ ) und *variable light chain* ( $V_L \kappa$  bzw.  $V_L \lambda$ )) folgte die periplasmatische Expression der murinen Fabs in *E.coli*. (Stamm JM83). Hierzu wurde der Expressionsvektor an Tag 1 mittels Elektrotransformation in JM83 eingebracht (siehe 2.2.10.). Die Zellen wurden in 5 ml  $LB_{Amp}$ -Medium über Nacht bei 37°C und permanentem Schütteln inkubiert. Morgens an Tag 2 wurde 1 ml der Inkubation als eigentliche Vorkultur (VK) in 50 ml  $LB_{Amp}$ -Medium unter permanentem Schütteln mittels Orbitalschüttler (150 rpm, 24 h, 22°C) angezogen. Für die Hauptkultur (HK) an Tag 3 wurden 20 – 25 ml der VK in 1000 ml  $LB_{Amp}$ -Medium angesetzt und unter permanentem Schütteln und photometrischer Messung bis zu einer OD von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (AHT), dessen Bindung an den Tet-Repressor ( $Tet^R$ ) im Expressionsvektor und die Abdissoziation desselben wurde die Expression des Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteins induziert. 3 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet auf zwei 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und mittels Ultrazentrifuge in einem SLA-3000 Rotor abzentrifugiert (5000g, 12 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets bei -80°C eingefroren. An Tag 4 wurden diese auf Eis aufgetaut und in je 10 ml Aufschluss-Puffer P (siehe 2.1.5.6.) resuspendiert. Der Aufschluss des Periplasmas erfolgte für 30 min auf Eis. Danach wurden die Zellen in 50 ml-Zentrifugenbecher überführt und in einem SA-300 Rotor abzentrifugiert (15000 rpm, 15 min, 4°C). Die Überstände von je 10 ml wurden vereinigt und mit 5 µl Benzoase (25 U/µl) und 200 µl 1M  $MgCl_2$  versetzt. Das Enzym, welches im Gegensatz zu herkömmlicher DNase auch bei 4°C arbeitet, sollte freigewordene DNA toter Zellen abbauen, welche ansonsten bei der später folgenden Säulenaufreinigung die Säulenmatrix verstopfen würde. Mit der Zugabe von  $MgCl_2$  sollten die zuvor durch EDTA aus Puffer P komplexierten  $Mg^{2+}$ -Ionen ersetzt werden, da diese für die DNase-Reaktion von Nöten sind. Der so isolierte periplasmatische Aufschluss wurde für 30 min auf Eis inkubiert und abschließend mittels 0,22 µm- Spritzenfilter (siehe 2.1.1.) sterilfiltriert.

### 2.4.3. Proteinaufreinigung

Nach periplasmatischer Expression wurden die Fab-Fragmente mittels *Strep tag*<sup>®</sup>-*Strep-Tactin* Affinitätschromatographie aufgereinigt, wofür *Strep-Tactin* beladene *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup> (IBA) benutzt wurden. Alle Schritte der Aufreinigung wurden unter Kühlraumbedingungen bei 4°C durchgeführt. Die bei pH 7,5 und 4°C gelagerten 1 ml-Säulen wurden als erstes 2x mit 2,5x Säulenvolumen (SV) des Waschpuffers W äquilibriert. Danach wurde der nach DNase-Verdau sterilfiltrierte periplasmatische Aufschluss Schritt für Schritt auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss folgten fünf Waschschritte à einem SV ehe die in der *Strep-Tactin*-Matrix zurückgehaltenen Frag-

Fragmente nun mittels Elutionspuffer E abgelöst wurden. Es wurden drei Elutionsfraktionen entnommen: Elutionsfraktion 1 (E1) durch Auftragen von 0,8x SV, E2 durch Auftragen von 1,2 SV, E3 durch Auftragen von 1 SV. Nur E2 wurde in der Folge dialysiert und schließlich für Färbetests verwendet. Die beiden anderen Elutionsfraktionen wurden für eventuelle spätere Analysen bei -20°C gelagert. Nach Säulenaufreinigung folgte die Umpufferung des Proteins gegen PBS. Hierzu wurde E2 in ein ca. 4 cm<sup>2</sup> großes Stück Dialysemembran (Spectra/Por®, MWCO: 6000 – 8000; siehe 2.1.1.) überführt, welches an den offenen Enden mit Verschlussklammer (siehe 2.1.1.) abgedichtet wurde. Es erfolgten zwei Umpufferungen in jeweils 2 l sterilem PBS bei 4°C unter langsamem Rühren für je mind. 6 h. Abschließend wurde das aufgereinigte, umgepufferte Fab-One-STrEP *Strep*-tag® Fusionsprotein zu je 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.4. Präparatorischer Aufschluss und Gewinnung von Lymphozyten aus murinen Organen

Für FACS-Analysen, FACS-Sortierungen, *in vitro* Kultivierungen und alle in dieser Arbeit beschriebenen Färbexperimente mit konventionellen Antikörpern oder Fab-Streptameren wurde Zellmaterial aus naiven Mäusen entnommen um daraus gemäß der folgenden Beschreibungen Lymphozytenfraktionen zu isolieren. Hierzu wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, eröffnet und ihnen verschiedene Organe entnommen, wobei in erster Linie Milz und Lymphknoten (zervikal, axillär, renal, mesenterial, inguinal, sakral) entweder getrennt oder zusammen Verwendung fanden. Die Organe wurden für die Dauer der Präparation in 5 ml RP10<sup>+</sup>-Medium gelagert und im Anschluss durch Homogenisierung über einem Nylonnetzfilter (siehe 2.1.1.) mittels 2 ml-Spritzenkolben desintegriert. Nach Spülen des Filters mit weiteren 5 ml RP10<sup>+</sup>-Medium wurde die Suspension zentrifugiert (1500 rpm, 6 min, 4°C) und das Pellet für den Schritt der Erythrozytenlyse in 3 ml ACT-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 ml RP10<sup>+</sup>-Medium gestoppt. Zur Isolierung von Lymphozyten des peripheren Blutes wurde Mäusen Blut aus Backe oder Schwanzvene entnommen. Waren größere Mengen von Nöten wurden die Mäuse mit Chloroform getötet, zügig eröffnet und das Blut durch Punktion des Herzens abgesaugt. Blutproben wurden generell in Heparin benetzten Röhrchen aufgefangen und in 10 ml ACT für 10 min lysiert. Um Knochenmark zu isolieren wurden Femora und Tibiae aller vier Extremitäten mit RP10<sup>+</sup>-Medium perfundiert, das Knochenmark wie oben beschrieben durch Nylonnetze filtriert und in 3 ml ACT-Puffer für 5 min lysiert. Nach einer Erythrozytenlyse wurden die Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 6 min, 4°C), in 10 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und nach Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer (siehe unten) erneut abzentrifugiert. Entsprechend der Zellzahl wurde das Pellet abschließend in FACS-Puffer resuspendiert und nochmals durch ein Nylonnetz filtriert um Aggregate toter Zellen von der Suspension zu trennen. Bis zu weiteren Schritten verblieben die Zellen auf Eis.

#### 2.4.5. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl bei Lymphozytenpräparation, nach FACS-Sortierung oder beim Ansetzen eines Suppression Assays wurde standardmäßig die Neubauer Zählkammer verwendet. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit einer Trypanblau-Verdünnung (10 µl Trypanblau, 180 µl PBS) im Verhältnis 1 : 20 verdünnt. Trypanblau diente hier der Lebend-Tod Diskrimination, da der Farbstoff auf Grund aufgehobener Membranintegrität abgestorbener Zellen in diese eindringt und sie blau färbt. 10 µl der angefärbten Zellsuspension wurden in die Kammer pipettiert und bei 10x Vergrößerung mikroskopiert. Es wurden nur ungefärbte Zellen gemäß der L-Regel gezählt. Die absolute Zellzahl ergab sich unter Einbeziehung von Kammervolumen, Probenvolumen und Verdünnungsfaktor aus folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen/ausgezählte Kammern} \times \text{Probenvolumen} \times 20 \times 1 \times 10^4$$

#### 2.4.6. Polyklonale Stimulation naiver T-Zellen

Zur polyklonalen Stimulation FACS-sortierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden diese zusammen mit ebenfalls FACS-sortierten autologen APCs (*antigen presenting cells*) gemischt und mit aCD3 Antikörper versetzt. Im Detail wurden hierzu in einer 96-well Platte pro well je 100.000 APCs mit 100.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in 200 µl RP10<sup>+</sup>-Medium aufgenommen und mit 1 µg/ml aCD3 stimuliert. Die so angeregten Zellen wurden z.B. für Suppression Assays benutzt (siehe 2.4.7.) oder nach Übernachtskultur bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank in Zytokin-Analysen gefärbt. Im zweiten Fall wurde 2 h nach αCD3 Stimulus 2 µl/ml Brefeldin A (GolgiPlug™) zugegeben um die intrazellulären Proteintransportprozesse zu blockieren und so eine Akkumulation der produzierten Zytokine im Golgi-Apparat herbeizuführen. Als Kontrolle wurden ansonsten gleich behandelte Zellen polyklonal mittels 20 ng/ml PMA/Ionomycin stimuliert

#### 2.4.7. Suppression Assay mittels CFSE bzw. eFluor® 670 cell proliferation dye

Das suppressive Potential natürlicher regulatorischer T-Zellen gegenüber proliferierenden aktivierten CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen gilt als zentrale Eigenschaft der nTregs. Zu dessen Untersuchung bedient man sich standardmäßig eines Suppression Assay mit fluoreszenten Proliferationsfarbstoffen wie CFSE oder eF670. Hierzu wurden aus den präparierten murinen Lymphozyten-Suspensionen zweier Mäuse (siehe 2.4.4.) drei Zellpopulationen mittels FACS-Sortierung isoliert:

- aus einer C57BL/6 Maus – CD45.1<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen als autologe APCs und CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effektoren als Tresp (T-responder-Zellen)
- aus einer C57BL/6 Maus mit congenem Marker CD45.1 (CD90.1) – CD45.1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs.

Nach der FACS-Sortierung wurden die APCs mit 25 Gy radioaktiv bestrahlt, während die Tresp mit 1  $\mu$ M CFSE bzw. eFluor® 670 gefärbt wurden und die Tregs bei 37°C im Brutschrank ruhten. Vor Ansetzen der Kultur in einer 96-well Platte wurden alle Zellfraktionen noch einmal gezählt, abzentrifugiert (4°C, 1500 rpm, 6 min) und in entsprechendem Volumen warmen RP10<sup>+</sup>-Mediums aufgenommen. Pro well wurden nun 100.000 APCs, 100.000 für die Proliferation markierte Tresp und Tregs in verschiedenen Titrationsstufen zusammen in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l aufgenommen und mit aCD3 stimuliert (siehe 2.4.6.). Als Referenz für maximale Proliferation nach aCD3 Stimulation wurden wells ohne Tregs angesetzt, als Kontrolle für ruhende Tresp wells ohne Tregs und ohne aCD3. Während der Inkubation von 3-4 Tagen wurde der Proliferationsfarbstoff bei Zellteilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und somit gleichsam verdünnt. Nach Kultivierung wurden die Zellen geerntet und für die FACS-Analyse mit Antikörpern (CD45.1, CD4, CD25) gefärbt, wobei in der Auswahl der Fluoreszenzkonjugate auf die Farbe des Proliferationsmarkers (CFSE: FITC, eFluor® 670: APC) verzichtet werden musste.

## 2.5. FACS UND FÄRBEMETHODEN

### 2.5.1. Multimerisierung muriner Fab-Streptamere

Ein einfacher Ansatz für die Streptamer Färbung von  $5 \times 10^6$  Zellen setzte sich analog zum Protokoll der humanen Fab-Streptamere (IBA BioTagnologies) standardmäßig aus 0,75  $\mu$ g *Strep*-Tactin (wahlweise konjugiert mit PE oder APC) und 0,2  $\mu$ g murinem Fab zusammen, wobei die optimale Menge an Fab pro Ansatz für jedes hergestellte Fab-Konstrukt neu titriert wurde. In allen hier beschriebenen Experimenten zu Streptamer Färbungen wurde, wenn nicht abweichend erläutert 0,75 *Strep*-Tactin PE/APC nach gründlichem Aufschütteln mittels Vortexer in einem PCR-Tube mit entsprechend optimierter Menge Fab gemischt und für 40 min oder über Nacht bei Dunkelheit und 4°C inkubiert. Abweichend hiervon wurden auch wesentlich kürzere Inkubationszeiten oder eine direkte Färbung ohne vorherige Inkubation der Einzelkomponenten durchgeführt. Jeder Ansatz wurde auf Eis pipettiert.

### 2.5.2. Antikörperfärbung vs. Streptamer Färbung

#### 2.5.2.1. Färbung

Konventionelle **Antikörperfärbungen** für FACS-Analysen wurden standardmäßig in 96-well Platten durchgeführt. Pro well wurden hierzu  $5 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l kaltem FACS-Puffer eingesetzt. Für die

Analyse sehr kleiner Zellpopulationen, beispielsweise nach Adoptivem Zelltransfer (siehe 2.6.2.) oder bei Färbeansätzen vor FACS-Sortierungen wurden mindestens  $5 \times 10^7$  bis über  $1 \times 10^8$  murine Zellen in 15 ml-Röhrchen und entsprechend nach oben skaliertem Volumen eingesetzt. Antikörper wurden entsprechend ihrer optimalen Verdünnung (siehe 2.1.10.) zugegeben, der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gemischt und im Anschluss für 20 min bei Dunkelheit und auf Eis inkubiert. Bei Färbungen in 96-well Platten wurde der Ansatz danach 3x mit kaltem FACS-Puffer auf 200  $\mu$ l aufgefüllt, gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 2 min, 4°C). Das Pellet wurde abschließend erneut in 200  $\mu$ l resuspendiert, in 1,2 ml FACS-Röhrchen überführt und unmittelbar vor der FACS-Analyse zur Lebend-Tod Diskrimination mit Propidiumiodid (PI) versetzt. Hierzu wurde PI, welches als Nukleinsäureinterkalator nur in tote Zellen mit aufgehobener Membranintegrität eindringt und diese anfärbt für jede Färbung standardmäßig als Vorverdünnung (1:250) in kaltem FACS-Puffer angesetzt, vor der FACS-Analyse 1:1 (Endkonzentration 1:500) auf die gefärbten Zellen gegeben und mittels Vortexer gemischt. Färbungen in 15 ml-Röhrchen wurden einmal mit kaltem FACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt, gemischt und zentrifugiert (1500 rpm, 6 min, 4°C). Für FACS-Sortierungen wurde das Pellet in 500  $\mu$ l kaltem FACS-Puffer resuspendiert und analog zu oben 1:1 mit PI gemischt.

Prinzipiell können **Fab-Streptamer Färbungen** analog zu einer oben beschriebenen konventionellen Antikörperfärbung angesetzt werden, wobei jedoch in einigen Punkten auf Abweichungen geachtet werden muss. Bei einer Einfach-Streptamer Färbung, d.h. einem Anfärben der Zellen mit ausschließlich einem Streptamer-Reagenz oder Streptamer in Kombination mit einem oder mehreren Antikörpern konnte bei einfachen Ansätzen ( $5 \times 10^6$  in 96-well Platten) wie beschrieben vorgegangen werden. Große Färbungen in 15 ml-Röhrchen wurden jedoch auch bei Zellzahlen über  $1 \times 10^8$  nur in Volumina bis max. 300  $\mu$ l FACS-Puffer angesetzt um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen. Nach Inkubation der Färbung wurde der Ansatz 2x in 10 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen. Bei Mehrfach-Streptamer Färbungen, d.h. einem Anfärben der Zellen mit verschiedenen Streptamer-Reagenzien musste jedes einzeln und durch Waschschrte von den anderen getrennt eingesetzt und inkubiert werden. Hierzu wurden die Fab-Streptamere wie beschrieben multimerisiert (siehe 2.5.1.) und bis zum Einsatz bei Dunkelheit und 4°C gelagert. Es wurde, auch bei kleinen Zellzahlen ausschließlich in 15 ml-Röhrchen gefärbt um Waschschrte in großem Volumen zu ermöglichen. Beginnend mit dem ersten Fab-Streptamer wurden die Zellen in max. 300  $\mu$ l FACS-Puffer wie beschrieben für 20 min auf Eis inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte in 10 ml kaltem FACS-Puffer und Zentrifugationen (1500 rpm, 6 min, 4°C) ehe das Pellet wieder in max. 300  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und das nächste Fab-Streptamer zugegeben wurde. Nach der letzten Inkubation wurden die Zellen noch zwei Waschrten unterzogen und abschließend entweder in 200  $\mu$ l resuspendiert und für FACS-Analysen in 1,2 ml FACS-Röhrchen überführt oder bei größeren Färbeansätzen für FACS-Sortierung in 500  $\mu$ l aufgenommen. Die Zellen wurden im letzten Schritt analog zur erläuterten Antikörperfärbung mit PI gefärbt.



## 2.5.2.2. Ablösung

Um die Schlüsseleigenschaft der hergestellten murinen Fab-Reagenzien, deren Ablösbarkeit zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein standardisiertes Ablöse-Experiment verwendet, welches sich an die Tests humaner Fab-Streptamer anlehnt.<sup>165</sup> Hierbei wurde als erstes ein 5x Ansatz des zu untersuchenden Fab-Streptamers wie beschrieben angesetzt und multimerisiert (siehe 2.5.1.). Davon wurde nach abgeschlossener Inkubation die Hälfte entnommen um in einem 3x Ansatz  $1,5 \times 10^7$  Zellen in 150  $\mu$ l kaltem FACS-Puffer anzufärben. Nach durchgeführter Färbung in einem 15 ml-Röhrchen (siehe 2.5.2.1.) wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, ein Aliquot von 50  $\mu$ l entnommen und in eine 96-well Platte auf Eis überführt (Aliquot 1). Zu den übrigen 950  $\mu$ l der Probe wurden 100  $\mu$ l D-Biotin (100mM) zugegeben und das Gemisch mit kaltem FACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt, geschwenkt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Biotin-Schritt wurde noch einmal wiederholt, um anschließend erneut ein Aliquot von 50  $\mu$ l zu entnehmen und auf die Platte zu überführen (Aliquot 2). Während der beiden Biotin-Waschschritte werden die Fab-Streptamer Komplexe aufgebrochen, da D-Biotin auf Grund seiner vielfach höheren Affinität zum *Strep*-Tactin-Rückgrad ( $K_D \sim 10^{-13}$ M) die One-STrEP *Strep*-tag<sup>®</sup> Moleküle ( $K_D \sim 10^{-6}$ M) kompetitiv aus den Bindungstaschen verdrängt. Es folgten nun vier Wasch- und Inkubationsschritte in je 10 ml FACS-Puffer à 10 min, wobei nach dem ersten und dem letzten Schritt erneut Aliquots entnommen wurden (Aliquot 3 und 4; Nr. 4 entspricht dem Rest-Pellet). Während dieser Schritte wurden abdissoziierte Fab-Monomere und verbliebenes D-Biotin abgereichert. Aliquot 1 und 2 wurden direkt mittels FACS analysiert, während Aliquot 3 und 4 vorab nochmals halbiert und nachgefärbt wurden. Die Nachfärbung einer Probenhälfte von Aliquot 3 bzw. 4 erfolgte mittels 5  $\mu$ l *Strep*-Tactin PE bzw. APC, die der anderen mittels je einer Hälfte des verbliebenen Fab-Streptamer Ansatzes, so dass schlussendlich der gesamte 5x Ansatz aufgebraucht wurde. In der Nachfärbung sollte die Probe auf an Zellen verbliebene Fab-Monomere hin untersucht bzw. die Möglichkeit einer erneuten Streptamer Färbung und die erfolgreiche Abreicherung von D-Biotin demonstriert werden.

Generell wurden parallel zu jeder Färbung *single colors* angesetzt – kleine Proben von  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen, die einzeln mit Konjugat-äquivalenten Antikörpern aller in der Hauptfärbung verwendeten Fluorochrome gefärbt wurden, mindestens jedoch mit solchen, die eine Kompensation (siehe 2.5.5.) erforderten.

Alle Färbe- und Waschschritte wurden strikt auf Eis durchgeführt. Es wurde ausschließlich mit gekühlten Puffer und Reagenzien gearbeitet.

## 2.5.3. CFSE- bzw. eFluor<sup>®</sup> 670-Färbung

Mit Hilfe eines Suppression Assays kann das die Zellteilung hemmende Potential von regulatorischen T-Zellen untersucht werden, indem die Proliferation sog. Tresp (T-responder-Zellen, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>

Effektoren) sichtbar gemacht wird. (siehe 2.4.7.) Zu dieser Proliferationsanalyse kann der im Bereich von FITC strahlende Fluoreszenzfarbstoff CFSE, genauer CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Succimidylester) oder der im Bereich von APC emittierende eFluor® 670 proliferation dye (siehe 2.1.2.) verwendet werden. Beide Stoffe diffundieren durch die Zellmembran und binden dort irreversibel an primäre Amine zytoplasmatischer Proteine. Im Zuge der Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben und somit gleichsam verdünnt. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität lässt somit Rückschlüsse auf die Anzahl der Zellteilung zu. Die anzufärbenden Tresp wurden nach FACS-Sortierung zweimal in 10 ml warmem PBS gewaschen um überschüssiges FCS abzureichern, welches die Färbung abpuffern würde. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl/ 1 x 10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen und 1:1 mit dem gleichen Volumen einer CFSE- bzw. eFluor® 670-Vorverdünnung (2 µM) gemischt um eine Endkonzentration des Farbstoffs von 1 µM zu erreichen. Die Inkubation erfolgte für CFSE bei Raumtemperatur und Dunkelheit für 3 min, bei eFluor® 670 bei 37°C und Dunkelheit für 10 min. Danach wurde die Färbung wurde mit 10 ml kaltem RP10<sup>+</sup>-Medium abgestoppt, für 4 min auf Eis inkubiert und 2x mit je 10 ml RP10<sup>+</sup>-Medium gewaschen. Vor der weiteren Verwendung der Zellen im Suppression Assay wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt (siehe 2.4.5.) um den Zellverlust durch die eigentlich zytotoxischen Farbstoffe zu detektieren. Bei weiteren Antikörperfärbungen der proliferationsmarkierten Zellen musste in der Auswahl der Fluoreszenzkonjugate auf die Farbe des Proliferationsmarkers (CFSE: FITC, eFluor® 670: APC) verzichtet werden. Außerdem ist vor allem bei der Verwendung PE-konjugierter Antikörper in Kombination mit CFSE auf eine sorgfältige Kompensation während der FACS-Analyse zu achten.

#### 2.5.4. Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICCS), Foxp3- und KI 67-Färbung

Für intrazelluläre Zytokinfärbungen und intranukleäre Färbung z.B. des Transkriptionsfaktors Foxp3 oder des Zellzyklusproteins KI 67 müssen die anzufärbenden Zellen permeabilisiert werden um ein Eindringen der Farbstoffe in die Zelle zu ermöglichen. So kann jedoch eine Lebend-Tod Diskrimination mit Propidiumiodid (PI) nicht stattfinden, da PI in alle Zellen diffundieren würde. Daher muss bei dieser Art von Färbeprotokoll vor einer Permeabilisierung als erstes eine stabile Lebend-Tod Färbung mittels Ethidiummonoazid (EMA) durchgeführt werden, da das lichtempfindliche EMA während der Inkubation an Licht kovalent an die DNA bindet und auch bei folgender Permeabilisierung in den toten Zellen verbleibt. Erst nach diesem Schritt erfolgen Oberflächenfärbung, Zellpermeabilisierung und ICCS bzw. intranukleäre Färbung. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zytokin- bzw. Foxp3-Färbungen wurden in 96-well Platten angesetzt. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 50 µl FACS-Puffer wurden 1:1 mit einer EMA-Vorverdünnung (1:1000) zu einer Endkonzentration von 1:2000 vermischt und für 12 min unter Lampenlicht auf Eis inkubiert. Nach 2 x Waschschritten in je 200 µl kaltem FACS-Puffer wurde entweder eine Oberflächenfärbung durchgeführt (siehe 2.5.2.1.) oder gleich zur Zellpermeabilisierung geschritten. Hierzu wurden die Zellpellets in 100 µl Fixierungs-

/Permeabilisierungslösung (eBioscience; 1 Teil Konzentrat : 3 Teilen Verdünnungslösung) des Foxp3 Staining Buffer Sets (eBiosciences) resuspendiert und für 30 min inkubiert. Nach 2x Waschschritten in 200 µl Permeabilisierungspuffer (eBioscience, 1 : 10 mit FACS-Puffer verdünnter 10x Puffer) wurden die Zellen in 50 µl des Puffers aufgenommen, Zytokin-Antikörper bzw. Foxp3 oder KI 67 zugegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2x Waschschritten in 200 µl Permeabilisierungspuffer und einem abschließenden Waschschriff in 200 µl FACS-Puffer wurden die Zellpellets in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und für die FACS-Analyse in 1,2 ml FACS-Röhrchen überführt.

### 2.5.5. FACS-Analyse

Der Begriff der Durchflusszytometrie beschreibt ein quantitatives Messverfahren zur physikalischen, morphologischen und molekularen Analyse einzelner Zellen, sowie ganzer Zellpopulationen, die mit hoher Geschwindigkeit innerhalb eines laminaren Flusses, durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt, einen Laserstrahl passieren und so auf Grund ihrer von Detektoren (Photomultiplier) erfassten Lichtstreuung Auskunft über Größe und Struktur geben. Dabei entspricht das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), als Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter), äquivalent der Brechung des Lichts im rechten Winkel gibt Auskunft über Granularität und Kernstruktur der Zelle. Allein hierdurch können die Zellfraktionen des Blutes grob aber verlässlich eingeteilt werden. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) stellt nun eine Erweiterung der detektierten Eigenschaften um den Parameter Farbe dar. Hierzu können Zellen bzw. deren charakteristische Oberflächenmoleküle mittels spezifischer Fluoreszenz-konjugierter Antikörper selektiv angefärbt werden. Drei Laser verschiedener Wellenlänge regen die Fluorochrome an vorbeiströmenden Zellen zur Photonenemission in einem bestimmten Spektrum (siehe Tabelle) an, was wiederum durch Photomultiplier erfasst und signalverstärkt weitergegeben wird. Die Signalstärke korreliert hierbei mit der Konzentration des fluoreszierenden Antikörpers auf der Zelloberfläche. Da sich die Emissionsspektren einzelner Fluorochrome überlappen, muss über optische Interferenzfilter eine Kompensation der Messung erfolgen. Hierzu wird kurz gesagt von Farbstoff A der Anteil an Fluoreszenz, welcher in den Kanal von Farbstoff B hineinstrahlt von diesem abgezogen und umgekehrt. Die Tatsache, dass wesentlich mehr Fluoreszenz-Konjugate gleichzeitig in einer Messung Verwendung finden können, als Laser in einem Gerät verbaut sind, wird durch das Vorhandensein spezieller Filter ermöglicht. Diese trennen Fluoreszenzsignale, welche auf Anregung des selben Lasers beruhen und leiten sie an verschiedene Detektoren weiter. Die in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen wurden an den Geräten CyAn ADP LX 314 bzw. CyAN ADP P8 (Beckman Coulter) durchgeführt. Während einer Analyse wurden nach Möglichkeit mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen mit Summit V4.3 eingelesen. Bei Untersuchungen seltener Ereignisse d.h. sehr kleiner Zellpopulationen z.B. nach

Transferexperimenten wurden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen eingelesen. Die Daten wurden mit der Software FlowJo (Treestar) ausgewertet.

Fluorochrom	Laser	Absorptionsmax. (nm)	Emissionsmax. (nm)
FITC	488	490	525
PE	488	490; 565	578
PerCP-Cy5.5	488	490	695
PE-Cy7	488	496; 546	785
Pacific Blue	405	416	455
APC	642	650	661

### 2.5.6. FACS-Zellsortierung

Um einzelne Zellpopulationen nicht nur zu analysieren, sondern sie tatsächlich physikalisch voneinander trennen zu können und somit gewünschte Zellfraktionen aus einer Probe anzureichern, ist ein *cell sorter* nötig. Die Maschine, welche im Prinzip wie ein FACS-Gerät arbeitet, ist um eine sog. *nozzle* erweitert, eine Düse, welche dem Photomultiplier nachgeschaltet ist und mit Hilfe ihres piezoelektrischen Kristalls den laminaren Flüssigkeitsfaden an seinem Ende durch hochfrequente Druckschwankungen oder Vibrationen auflöst und in einzelne Tropfen zerlegt. In diesen Tropfen sind die gewünschten Zellen nun gefangen und werden je nach Oberflächenladung des Tropfens durch ein Magnetfeld in verschiedene Richtungen abgelenkt um in dafür positionierte Auffangröhrchen zu fallen. Für die in der vorliegenden Arbeit an MoFlo oder FACSAria (Beckman Coulter) durchgeführten Zellsortierungen wurden in der Regel  $1 \times 10^8$  Zellen gefärbt, abschließend in 500  $\mu$ l kaltem FACS-Puffer aufgenommen und kurz vor Sortierung mit PI versetzt (siehe 2.5.2.1.). Vor dem Einlesen in die Maschine wurden die Proben nochmals filtriert. Die gewünschten Zellpopulationen wurden direkt in kaltes, mittels 0,22  $\mu$ m Spritzenfilter (siehe 2.1.1.) frisch sterilfiltriertes FCS sortiert. Bei Experimenten mit Fab-Streptamer Färbungen wurden die Zellen in mit 1mM D-Biotin versetztes FCS sortiert. Für eine Reinheitskontrolle wurde nach abgeschlossener Zellsortierung je ein 10  $\mu$ l Aliquot der einzelnen angereicherten Zellfraktionen entnommen und nochmals mit der Maschine analysiert – das FCS wurde in diesen Fällen erst nach Aliquotentnahme mit D-Biotin versetzt. Die Daten wurden mit der Software FlowJo (Treestar) ausgewertet.

## 2.6. MAUSEXPERIMENTE

### 2.6.1. Diphtherietoxin-vermittelte Treg Depletion in DEREГ Mäusen

Die Depletion regulatorischer T-Zellen kann eine wichtige Möglichkeit sein, diese Subpopulation CD4<sup>+</sup> Zellen *in vivo* näher zu untersuchen. Hierzu stellen DEREГ-Mäuse ein möglicherweise essentielles Werkzeug dar. DEREГ (*DEpletion of REGulatory T cells*) ist eine BAC (*bacterial artificial chromosome*) - transgene Mauslinie, welche unter Kontrolle des Foxp3-Promotors einen eGFP-gekoppelten Diphtherietoxinrezeptor (DTR) trägt. Somit wird die *in vivo* Analyse und Depletion von Tregs durch Applikation von Diphtherietoxin (DT) ermöglicht. Da in dieser Arbeit benutzte DEREГ-Mäuse regelmäßig mit C57BL/6 verpaart wurden, mussten die Nachkommen vor Verwendung auf tatsächlichen transgenen Status hin untersucht werden. Diese **Typisierung** erfolgte durch Überprüfung des eGFP-Signals mittels FACS-Analyse einer Blutprobe. Hierzu wurden einer DEREГ-Maus ca. 100 bis 200 µl Blut aus der Backe entnommen und in ein mit Heparin benetztes Röhrchen überführt. Die Blutprobe wurde nach ACT-Lyse mit aCD4 APC gefärbt (siehe 2.5.2.1.) und per FACS-Analyse auf eine eGFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellpopulation hin untersucht, welche in ihrer Frequenz der von Tregs in C57BL/6 Mäuse entsprach. Die **Depletion** erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen durch i.p. Gabe von je 1 µg DT in 200 µl sterilem PBS. Nach adoptivem Zelltransfer an Tag 4 wurde die DT-Gabe bis zum Ende des Experiments jeden zweiten Tag fortgeführt. In einem Versuch erfolgte die erste DT-Gabe auch unmittelbar vor Zelltransfer.

### 2.6.2. Adoptiver Zelltransfer

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Treg-Transfers sowohl in Form kompletter Milzzell-Fractionen wie auch sortierter Populationen in verschiedene Mäuse (C57BL/6, RAG<sup>-/-</sup>, DEREГ) durchgeführt. Für den Transfer einer **Milzzell-Suspension** wurde die Milz einer CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 Maus präpariert (siehe 2.4.4.), gezählt (siehe 2.4.5.) und entweder mit aCD4 APC und aCD25 PE Antikörpern bzw. Fab-Streptameren gefärbt (siehe 2.5.2.1.) oder ohne Färbung belassen, jedoch in der Anzahl der Waschschriffe gleich behandelt. Da in den transferierten Milzzellen eine festgelegte Menge an Tregs enthalten sein sollte, wurde deren Frequenz durch FACS-Analyse eines aCD4 APC, aCD25 PE gefärbten Aliquots aus der übrigen Milzzell-Probe bestimmt und auf dieser Grundlage die Zahl der zu transferierenden Milzzellen berechnet. Für den Transfer einer aufgereinigten **Treg Population** wurde z.B. die Milz einer CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 Maus wie oben erläutert präpariert, gezählt und mit Antikörpern bzw. Fab-Streptameren gefärbt um anschließend durch FACS-Sortierung regulatorische T-Zellen hochrein angereichert weiterverwenden zu können. Mittels Fab-Streptamer gefärbte Tregs wurden nach der FACS-Sortierung zur Ablösung des Reagenz 2x in 1mM D-Biotin gewaschen (siehe 2.5.2.2.).

Sollten in einem solchen Versuch Antikörper gefärbte Tregs vergleichend transferiert werden, wurden auch diese nach Sortierung mit D-Biotin behandelt. Es wurden je nach Versuchsansatz und verfügbarer Ausgangszellzahl zwischen 100.000 und 400.000 regulatorische T-Zellen transferiert. Die Zellen wurden nach allen Färbe- und Waschschritten ein letztes Mal gezählt und deren gewünschte Zahl anschließend i.p. in 200 µl sterilem PBS transferiert. 8 Tage nach Transfer wurde das Experiment in der Regel beendet.

## 2.7. STATISTIK

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mit Hilfe der Programme Sigma Plot 10.0 und Prism 5 durchgeführt.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. HERSTELLUNG MURINER ANTI-CD4 UND ANTI-CD25 FAB-STREPTAMERE

Die Idee funktionelle natürliche regulatorische T Zellen (nTregs) schonender zu isolieren und sozusagen unberührt für zukünftige therapeutische Ansätze nutzbar zu machen, beruht auf der Vermutung, oberflächengebundene Färbereagenzien würden häufig mit der Funktionalität der markierten Antigene interferieren. Konventionelle Antikörperfärbungen, so zeigen Beobachtungen, könnten demnach im Zuge aktuell angewandter Selektionsverfahren, insbesondere im ungekühlten Zustand der Zellen, zu Internalisierungsprozessen oder Rezeptorblockierung führen und schließlich in unkontrollierter Stimulation oder Anergie der Zellen enden. (siehe 1.4) Um diesen Hinweisen experimentell nachzugehen, wurde mit vorliegender Arbeit das Prinzip der reversiblen Zellmarkierung auf eine Anwendung in der Maus übertragen. Hierbei konnten mit Hilfe reversibler Färbung gegen CD4 und CD25 murine nTregs gewonnen werden um diese *in vitro*, besonders aber mit *in vivo* Modellen auf bessere immuntherapeutische Nutzbarkeit hin zu untersuchen. Wie der folgende Abschnitt der Arbeit beschreibt, wurden für diese Idee erstmals murine Fab-*Streptamere* hergestellt.

### 3.1.1. Gewinnung der Einzelkomponenten eines Fab-Fragments mittels PCR

Da Antigenspezifität innerhalb einer Antikörperfärbung stets auf den variablen Regionen der Fab-Fragmente beruht, wurden bereits bestehende mAbs als Basis für die Erzeugung von reversiblen Fab-Streptameren verwendet. Zusätzliche Affinitätsmodifikationen durch Mutation der Fab-Sequenzen sollten die Reversibilität der Färbung sichern. Prinzipiell liegen Fab-Fragmente innerhalb eines Antikörpermoleküls entweder in zweifacher (IgG, IgA, IgE) oder zehnfacher (IgM) Ausführung vor, so dass die Antigen-Antikörper-Bindung immer auch eine Interaktion eines Antigens mit einem Multimer darstellt. Dieser natürliche Multimer-Charakter wird durch den Fab Streptamer-Komplex imitiert – mit dem Unterschied, dass dieser Komplex in seine Einzelbestandteile aufgebrochen werden kann und somit die Reversibilität der Färbung ermöglicht. (siehe 1.5.) Ein Fab-Fragment (ca. 50kDa, siehe 1.5.2.), als monomerer Baustein eines Streptamer-Komplexes, besteht aus schwerer und leichter Kette (je ca. 25kDa), die wiederum jede für sich in eine variable ( $V_H$  bzw.  $V_L \kappa$  oder  $\lambda$ , jeweils ca. 110 Aminosäuren) und eine konstante Region ( $C_H1$  bzw.  $C_L$ , jeweils ca. 110 Aminosäuren) aufgeteilt werden.

#### 3.1.1.1. Versuch einer halbspezifischen Amplifikation von $V_H$ , $C_H$ , $V_L \kappa/\lambda$ und $C_L$ mittels RACE-PCR

Um ein Fab-Streptamer generieren zu können, mussten als erstes die einzelnen Komponenten des Fabs ( $V_H$ ,  $C_H$ ,  $V_L \kappa/\lambda$  und  $C_L$ ) isoliert werden. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus zwei vorliegenden Ratten-Hybridom-Zelllinien PC61 (*IgG1 $\lambda$*  Antikörper gegen murines CD25) und GK1.5 (*IgG2b $\kappa$*  Antikörper gegen murines CD4) isoliert um daraus nach reverser Transkription die Fab-spezifischen Nukleotidsequenzen zu amplifizieren und anschließend in mehreren Klonierungsschritten ein Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Gesamtkonstrukt herzustellen. Da die exakten Sequenzen der variablen Regionen  $V_H$  bzw.  $V_L \kappa/\lambda$  nicht bekannt waren, wurde versucht diese Abschnitte mittels halbspezifischer RACE-PCR aus den – innerhalb einer Antikörperklasse und Spezies identischen und daher bekannten – konstanten Regionen  $C_H$  und  $C_L$  in Richtung der jeweils unbekannt variable Region zu amplifizieren. Für eine Hybridisierung C-terminal in der Hinge-Region der schweren bzw. der konstanten Region der leichten Kette wurden die spezifischen reverse Primer *IgG1 Hinge rev*, *IgG2b Hinge rev*, *IgG  $\lambda$  constant 1 rev*, *IgG  $\lambda$  constant 2 rev*, *IgG  $\kappa$  constant rev* entworfen. Als forward Primer dienten oligo-dT<sub>20</sub> Nukleotide, die nach poly-A Tailing am gegenüberliegenden Ende der cDNA an die angefügten Adenosin-Ketten der DNA-Matrizen binden konnten. Ergebnisse erster RACE-PCR Läufe zeigten in der gelelektrophoretischen Auftrennung keine eindeutigen Bandenmuster, sondern vielmehr eine Vielzahl von Fragmenten verschiedener Größe (Abb. 1 A). Auch Versuche, die Spezifität der PCR durch *poly-G Tailing* (oligo-dC<sub>20</sub> forward Primer) und Gradienten höherer *annealing*-Temperaturen ( $T_A = 40 - 60^\circ\text{C}$ ) zu verbessern, führten zu keiner Optimierung der Amplifikation. Vielmehr häuften sich PCR-Produkte zu geringer Größe, wohingegen potentiell korrekte Amplifikate, bestehend aus C-, V- und Hinge-Region sowie dem restlichen Abschnitt bis hin zu poly-A bzw. poly-G Terminus – ein Fragment

von notwendigerweise mindestens 1000 bp Länge – auch nach genannter Spezifizierung der Amplifikationsbedingungen kaum vermehrt auftraten (Abb. 1 B).

Ähnliche Verfahren wurden zur Gewinnung von Antikörpersequenzen aus Hybridomen – teils ebenfalls mittels halbspezifischer PCR nach *poly-G-Tailing* (Gilliland et al. 1996) – sowie bei der Herstellung chimärer Antikörperfragmente (Zhan et al. 2000; Rintisch et al. 2008) bereits beschrieben. Daher konnten in Anlehnung an darin publizierte Oligonukleotidsequenzen neue Primer synthetisiert werden um die oben beschriebene RACE-PCR nach *poly-G Tailing* zu wiederholen. Eine Amplifikation mit Hilfe der *reverse* Primer *IgG1 CH1* (für H<sub>PC61</sub>), *IgG2b CH1 g* und alternativ *IgG2b CH1 z* (für H<sub>GK1.5</sub>), *IgG κ rev* (für L<sub>GK1.5</sub>) und *IgG λ constant rev* (für L<sub>PC61</sub>) generierte zum Teil spezifischere Bandenmuster (Abb.1 C). Aus sämtlichen Experimenten wurden Amplifikate plausibler Größe (Beispiele dargestellt in Abb.1 A – C, \*Markierung und weißer Pfeil) mittels Sequenzierung und Datenbankanalyse untersucht. Jedoch konnte bis auf eine Probe keines der PCR-Produkte als Immunglobulin-Bestandteil identifiziert werden. Einzig das Produkt einer PCR für L<sub>PC61</sub> wurde als IgG1λ erkannt – dies jedoch unvollständig. Ein Ansatz mittels RACE-PCR wurde aufgrund dieser Problematik nicht mehr weiterverfolgt.

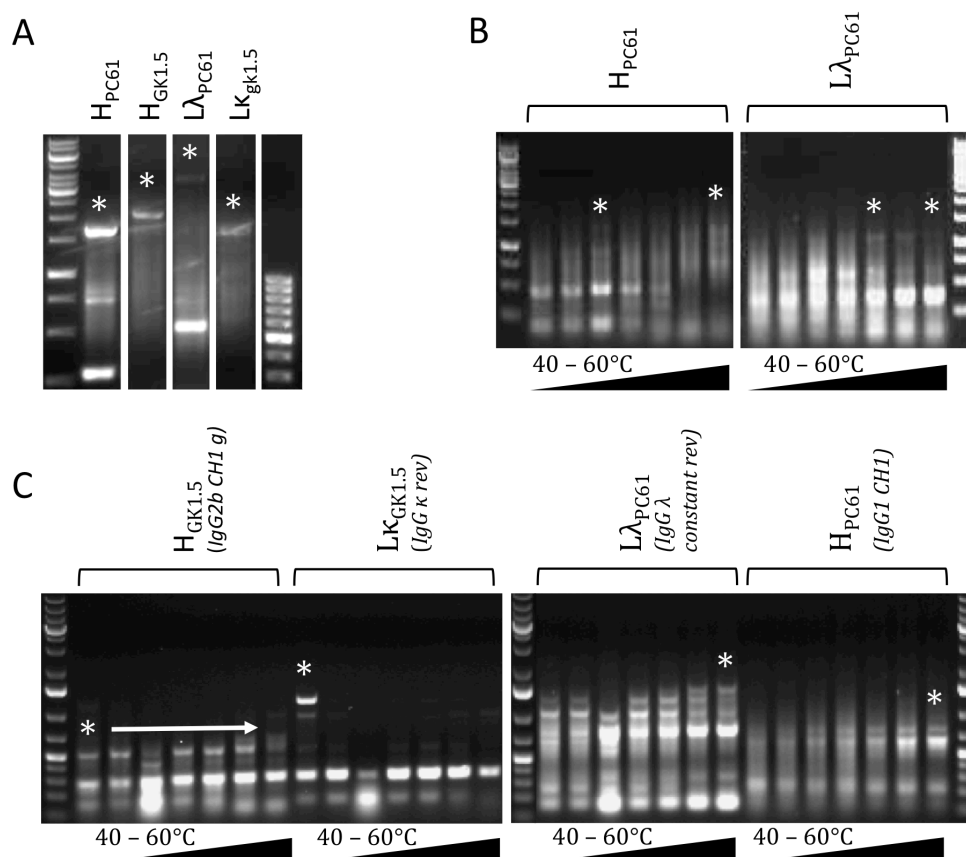


Abb. 1: Beispiele gelelektrophoretischer Auftrennungen nach RACE-PCR zur halbspezifischen Amplifikation schwerer und leichter Ketten der von Hybridom-Zelllinien PC61 und GK1.5 produzierten murinen Antikörper (PC61: anti-CD25, GK1.5: anti-CD4). (A) Standard RACE-PCR (HerculaseII DNA-Polymerase, *annealing* Temperatur ( $T_A$ ) = 50°C) erfolgte nach *poly-A Tailing* der cDNA. Amplifikation schwerer und leichter Kette mittels *forward* Primer *oligo-dT<sub>20</sub>* und *reverse* Primer *IgG1 Hinge rev*, *IgG2b Hinge rev*, *IgG λ constant 1 rev*, *IgG λ constant 2 rev*, *IgG κ constant rev*. Weiße \* markieren analysierte Banden zu erwartender Größe. (B) Auszüge einer Temperaturgradienten-PCR (HerculaseII-DNA-Polymerase,  $T_A$  = 40 - 60 °C, über je sieben Proben verteilter



Gradient) nach poly-G *Tailing*. Amplifikation mittels *forward Primer oligo-dC<sub>20</sub>* und genannten *reverse* Primern. Weiße \* markieren Laufbahnen analysierter Banden zweier Größenordnungen (schwache Banden >1000 bp, helle Banden von 400 – 500 bp). (C) Analoge Temperaturgradienten-PCR mittels *reverse Primer IgG1 CH1* (für  $H_{PC61}$ ), *IgG2b CH1 g* (für  $H_{GK1.5}$ ), *IgG2b CH1 z* (für  $H_{GK1.5}$ ), *IgG κ rev* (für  $L_{κGK1.5}$ ), *IgG λ constant rev* (für  $L_{λPC61}$ ). Weiße \* zeigen analysierte Banden, der weiße Pfeil markiert eine gesammelte Extraktion von Produkten gleicher Größe. Identifizierung der Amplifikate erfolgte durch Sequenzierung und Datenbankabgleich. Größenstandards: 1 kb und 100 bp Gene Ruler DNA Ladder.

### 3.1.1.2. Spezifische Amplifikation der variablen Regionen $V_H$ und $V_L κ$ bzw. $λ$

Nach dem gescheiterten Versuch einer halbspezifischen Amplifikation der Fab-Fragmente, wodurch die schwere bzw. leichte Kette in einem Schritt hätte gewonnen werden können, musste nun eine neue Idee zur Isolierung der Fab-Sequenzen aus den Hybridomen PC61 und GK1.5 gefunden werden. Zeitgleich zur Generierung der murinen Reagenzien konnten erste humane Fab-Streptamere bereits fertig gestellt werden.<sup>164</sup> Diese wurden mit Hilfe des noch in der Testphase befindlichen StarGate® Klonierungssystems (IBA, siehe 2.2.13.) aus Hybridom-Zelllinien (*(mouse (B cell); human (myeloma))*) gewonnen und kloniert. Dabei kamen Primer zum Einsatz mit deren Hilfe ausschließlich die variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L$  spezifisch amplifiziert und in späteren Klonierungsschritten mit den zugehörigen konstanten Regionen fusioniert wurden. Die Enden dieser Oligonukleotide wurden hierzu durch 5' *combinatorial sites* ergänzt – 4 bp kurze Sequenzabschnitte (*forward* Primer: - AATG -; *reverse* Primer: - TCCC -), die während der Rekombination in StarGate® Vektoren einer Rekombinase als Bindestellen dienten und so eine Insertion der V-Regionen in korrekter Orientierung ermöglichten. Obschon die genannten Primer ursprünglich für die Isolierung muriner DNA-Sequenzen aus anti-humanen Mausantikörpern entwickelt wurden, legten Vergleichsanalysen muriner V-Regionen und denen der Ratte die Vermutung nahe, die erwähnten IBA-Primer (siehe 2.1.8.) könnten eine spezifische Amplifikation von  $V_H$  und  $V_L$  aus PC61 (anti-CD25) und GK1.5 (anti-CD4) ermöglichen. Um damit der Gewinnung muriner Fab-Fragmente aus (*rat(B cell); mouse (myeloma)*)-Hybridomen einen Schritt näher zu kommen, wurde mit diesen *forward/reverse* Primerpaaren –  $V_H$  (für  $V_{H PC61}$  und  $V_{H GK1.5}$ ),  $V_L λ$  (für  $V_L λ_{PC61}$ ) und  $V_L κ$  (für  $V_L κ_{GK1.5}$ ) – eine spezifische Amplifikation (Standard-PCR, HerculaseII DNA-Polymerase) durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel zeigte das Bandenmuster einer spezifischen Amplifikation. Für alle vier Ansätze waren klar definierte Banden und – bis auf  $V_L λ_{PC61}$  – keinerlei Nebenprodukte zu erkennen. Die Banden von  $V_{H PC61}$ ,  $V_{H GK1.5}$  und  $V_{H GK1.5}$  entsprachen mit einer Länge von je ca. 300 bp der erwarteten Größen einer V-Region (ca. 110 Aminosäuren). Das PCR-Ergebnis von  $V_L λ_{PC61}$  unterschied sich sowohl in der Länge des Hauptprodukts von nur ca. 200 bp als auch durch das Vorhandensein mehrere größerer Nebenprodukte von den potentiell erfolgreich amplifizierten übrigen Produkten (Abb. 2 A). Sequenzierung nach Gelextraktion der distinkten Banden und anschließende Datenbankrecherche bestätigten die Vermutung, dass es sich bei den Amplifikaten  $V_{H PC61}$ ,  $V_{H GK1.5}$  und  $V_{H GK1.5}$  um die gesuchten V-Regionen der murinen Antikörper handelte, wohingegen die Sequenzanalyse von  $V_L λ_{PC61}$

negativ ausfiel. Da auch eine Wiederholung der Amplifikation für  $V_L \lambda_{PC61}$  kein neues Ergebnis erbrachte, wurde mit cDNA von PC61 eine neue PCR, sowohl mit dem zugehörigen Primerpaar  $V_L \lambda$ , als auch mit dem eigentlich für GK1.5 entworfenen  $V_L \kappa$  angesetzt. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem von PC61 produzierten Antikörper doch um die  $\kappa$ - und nicht um eine  $\lambda$ -Version handelte. Das Bild nach gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte als Positivkontrolle die erfolgreiche Amplifikation der schweren Kette von PC61 ( $V_H PC61$ ), jedoch keine Bande vergleichbarer Länge nach PCR mit Primerpaaren für die leichte Kette (Abb. 2 B, \* Markierung). Auch eine potentielle  $\kappa$ -Varianten von  $V_L$  konnte mit den vorhandenen Primerpaaren für die leichte Kette also nicht amplifiziert werden.

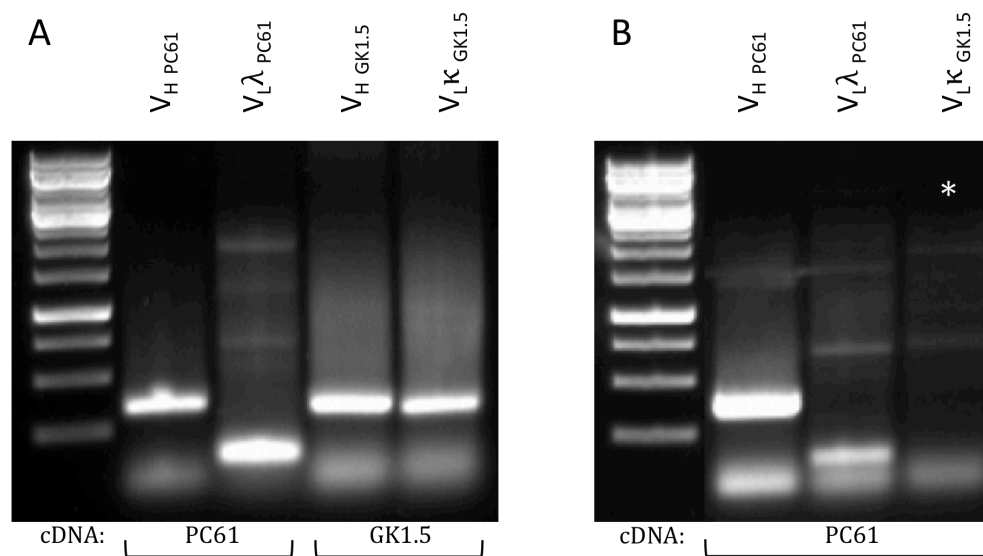


Abb. 2: Bild einer gelelektrophoretischen Auftrennung nach spezifischer Amplifikation der variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L$ . Als Template wurde die Gesamt-RNA der Hybridom-Zelllinien PC61 und GK1.5 (Produktion anti-muriner Antikörper – PC61: anti-CD25, GK1.5: anti-CD4) isoliert und mittels RT-PCR in cDNA transkribiert. (A) Eine Standard-PCR (HerculaseII DNA-Polymerase, *annealing* Temperatur ( $T_A$ ) = 50°C) erfolgte mittels spezifischer Primer  $V_H for/rev$  (für  $V_H PC61$  und  $V_H GK1.5$ ),  $V_L \lambda for/rev$  (für  $V_L \lambda PC61$ ) und  $V_L \kappa for/rev$  (für  $V_L \kappa GK1.5$ ) gemäß 2.2.1.1.. PCR-Produkte in hellen Banden von 300 bp Länge (bzw. 200 bp bei  $V_L \lambda PC61$ ) wurden extrahiert und sequenziert. (B) Die von PC61 produzierte  $V_L$  wird als  $\lambda$ -Variante angegeben. Nach negativem Sequenzergebnis von  $V_L \lambda PC61$  in (A), wurde zum Ausschluss potentiell produzierter  $\kappa$ -Varianten eine PCR mit PC61 cDNA und Primerpaaren  $V_L \lambda for/rev$  und  $V_L \kappa for/rev$  durchgeführt. Als Positivkontrolle diente  $V_H PC61$ .  $V_L \lambda PC61$  (PC61 Template,  $V_L \lambda for/rev$ ) zeigte ein Bandenmuster analog zu (A).  $V_L \kappa GK1.5$  (PC61 Template,  $V_L \kappa for/rev$ , durch weißes Sternchen markiert) zeigte kein PCR-Produkt relevanter Größe und Menge. Größenstandard: Gene Ruler 1kb DNA Ladder.

Da mittels Primer  $V_L \lambda$  nach wiederholten PCR-Läufen und verschiedenen *annealing* Temperaturen (Daten nicht gezeigt) keine spezifische Bindung zur V-Region der von PC61 produzierten anti-CD25 Antikörper erzielt werden konnte, wurden durch Datenbankrecherchen (IMGT) und Alignments (VectorNTI) verschiedene  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Varianten von murinen  $V_L$ -Regionen genauer untersucht und miteinander verglichen. Verwendeten Primer wurden ursprünglich für eine Amplifikation anti-humaner Fab-Fragmente aus muriner DNA entworfen und die Sequenz insbesondere des *forward*-Primers stellt naturgemäß eine Consensus-Sequenz für die Bindung an möglichst viele verschiedene V-Regionen dar.

Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, mit dem Primerpaar  $V_L\lambda$  könne die leichte Kette aus einem vorliegenden (*rat(B cell); mouse (myeloma)*) Hybridom wegen zu großer Sequenzunterschiede nicht isoliert werden. Ein Erklärung für dieses Problem wäre jedoch nicht in einem grundsätzlich zu großen Unterschied der Immunglobulin-Sequenzen von Maus und Ratte zu suchen gewesen, wurde doch  $V_L\kappa_{GK1.5}$  mittels  $V_L\kappa$  Primerpaar problemlos amplifiziert. Daher sollte die Heterogenität innerhalb des  $\lambda$ - bzw.  $\kappa$ -Klassements untersucht werden um eine Erklärung für die fehlende Primerspezifität bei  $\lambda$  zu finden.

Tatsächlich zeigte ein Alignment verschiedener  $\kappa$ -Varianten von leichten Ketten der Ratte eine relativ hohe Homogenität (94,8% Consensus-Positionen, 59,4% identische Positionen). Insbesondere der Bereich um die 5'-Primerbindestelle (1-50 bp,  $V_L\kappa$ ) stellte sich zwischen den verschiedenen Sequenzvarianten als gut konserviert dar (Abb. 3 A, obere Zeile). Im Unterschied dazu erbrachte ein Vergleich mehrerer  $\lambda$ -Varianten eine höhere Heterogenität (85,9% Consensus-Positionen, 40,6% identische Positionen), die zusätzlich gerade an dem, für die Primerhybridisierung von  $V_L\lambda$  *for* relevanten 5'-Ende von  $V_L\lambda$  ins Auge fiel. So wurden innerhalb von  $\lambda$  drei Subgruppen ausgemacht, die sich zumindest in dem für  $V_L\lambda$  *for* relevanten Sequenzabschnitt erheblich voneinander unterschieden (Abb. 3 A, untere Zeile).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden für einen neuen Amplifikationsversuch zwei Primeralternativen für  $V_L\lambda$  *for* entworfen. Die Position der neuen Oligonukleotide  $V_L\lambda$  *for* 2 und  $V_L\lambda$  *for* 3 wurde entsprechend des dargestellten Alignments gewählt (Abb. 3 A, untere Zeile). Für den erneuten Versuch einer Amplifikation wurde mit nun drei zur Auswahl stehenden *forward* Primern  $V_L\lambda$  *for* (*original*),  $V_L\lambda$  *for* 2 und  $V_L\lambda$  *for* 3 und bekanntem  $V_L\lambda$  *rev* eine Temperaturgradienten-PCR mit  $T_A = 40 - 60^\circ\text{C}$  (auf je 8 Proben verteilt) durchgeführt. Der Erfolg dieser PCR zeigte sich nach Auftrennung der Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Während aus der mit  $V_L\lambda$  *for* (*original*) versetzten cDNA über den gesamten Temperaturbereich hauptsächlich die bereits bekannten zu kleinen Produkte von 200 bp vervielfältigt wurden, fiel mit  $V_L\lambda$  *for* 2 vor allem eine temperaturabhängig an Intensität- zu und wieder abnehmende Bande bei ca. 400 bp auf. Zusätzlich wurden hier jedoch zahlreiche Nebenprodukte in der Auftrennung sichtbar. Die Amplifikation mit  $V_L\lambda$  *for* 3 schließlich zeigte das potentiell richtige Produkt von ca. 300 bp Länge unabhängig vom Temperaturgradienten stabil und in hoher Intensität im Agarose-Gel. Die deutlichen Banden (Abb. 3 B, \* Markierung und weißer Pfeil) wurden aus dem Gel extrahiert, vereint und wegen der hohen Ausbeute ohne vorherige pJet Klonierung direkt sequenziert. Sequenzierung und Datenbankanalyse ergaben das positive Ergebnis einer intakten und vollständigen  $V_L\lambda$ . Mit Amplifikation der leichten Kette  $\lambda$  waren nun alle vier V-Regionen isoliert, die für weitere Klonierungsschritte auf dem Weg zu funktionellen murinen Fabs gegen CD4 und CD25 benötigt wurden.

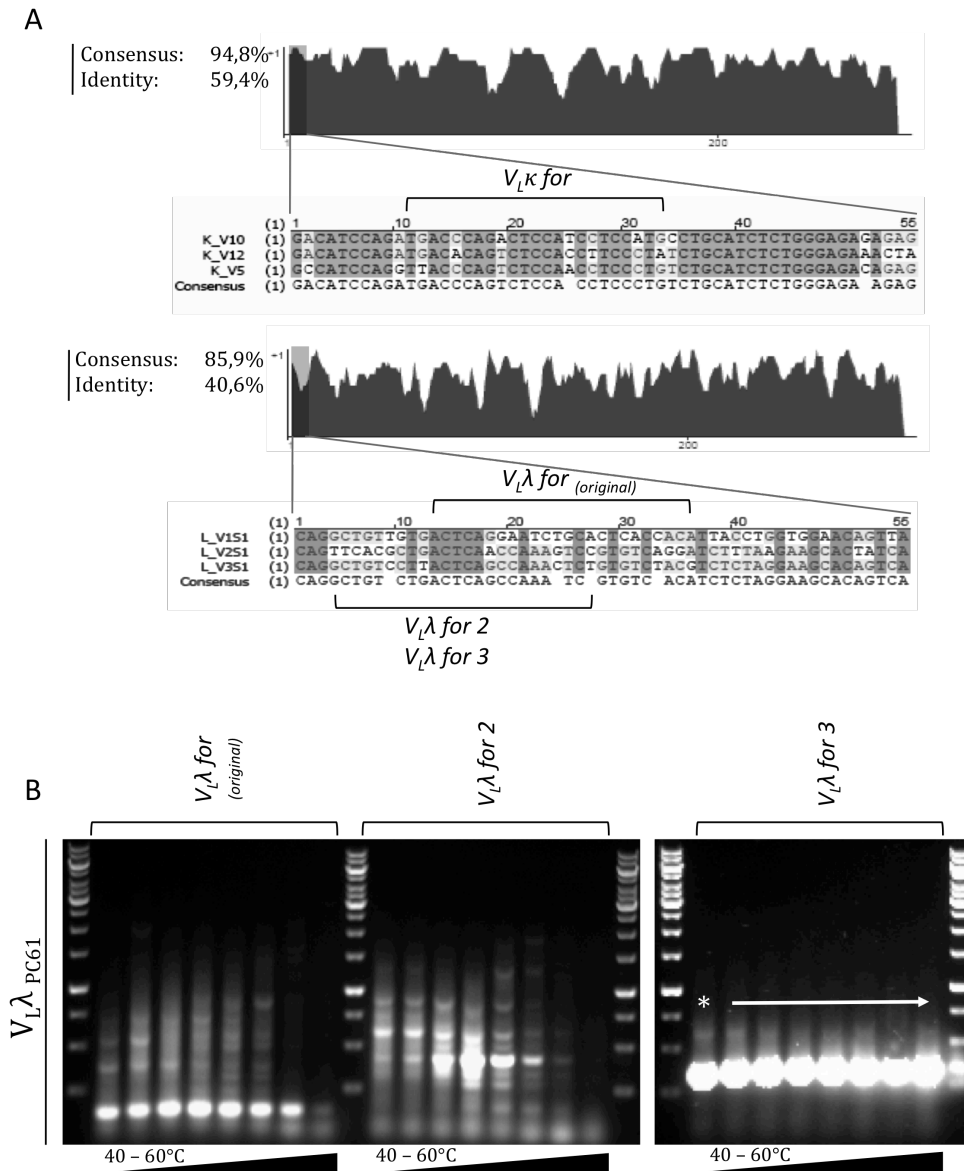


Abb. 3: Isolierung von  $V_L \lambda_{PC61}$ , der variablen Region leichter Kette aus Hybridom PC61 (Produktion von Antikörpern gegen murines CD25). (A) Ergebnisse einer vergleichenden Sequenzanalyse verschiedener V-Regionen innerhalb der  $\lambda$ - bzw.  $\kappa$ -Variante. Das Alignment der gesamten V-Regionen ist für  $\kappa$  (obere Reihe) und  $\lambda$  (untere Reihe) im Identitätsprofil dargestellt. Eine Detailansicht der ersten 55 bp (5'-Ende) mit Lage der ursprünglichen Primer von IBA findet sich in der Sequenzdarstellung darunter. Maxima und Minima der Profilsansicht geben Auskunft über Home- bzw. Heterogenität der Sequenzen im Vergleich, die Graustufen-Kodierung der Sequenzansicht stellt identische, abweichende oder Consensus- Basenabfolgen dar. Die entworfenen Alternativ-Primer *V<sub>L</sub>λ for 2* und *V<sub>L</sub>λ for 3* und ihre Lage innerhalb von  $V_L \lambda$  sind ebenfalls dargestellt. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung spezifischer Amplifikation von  $V_L \lambda_{PC61}$ . Temperaturgradienten-PCR (HerculaseII-DNA-Polymerase,  $T_A = 40 - 60^\circ\text{C}$ , über je acht Proben verteilter Gradient). Amplifikation mittels *forward* Primer *V<sub>L</sub>λ for (original)*, *V<sub>L</sub>λ for 2* und *V<sub>L</sub>λ for 3* bei bekanntem *V<sub>L</sub>λ rev*. Spezifische Amplifikate (300 bp) nach PCR mit *V<sub>L</sub>λ for 3*, die extrahiert, vereint und sequenziert wurden sind durch weißes Sternchen und weißen Pfeil markiert. Größenstandard: Gene Ruler 1kb DNA Ladder.

### 3.1.2. Klonierung der Einzelkomponenten zu einem Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsprotein

Nach erfolgreicher Amplifikation der Fab-spezifischen Nukleotidsequenzen  $V_{H\text{ PC61}}$ ,  $V_{H\text{ GK1.5}}$ ,  $V_{L\lambda\text{ PC61}}$  und  $V_{L\kappa\text{ GK1.5}}$ , mussten diese zunächst mit zugehörigen konstanten Regionen zusammengeführt und schwere Ketten darüber hinaus am konstanten 5' Ende mit einer *Strep-tag*<sup>®</sup> Sequenz fusioniert werden. Schlussendlich wurden die vollständigen leichten- und die schweren Ketten in einem finalen Vektor verbunden um die Expression eines Fabs in *E. coli* zu ermöglichen. Die einzelnen Schritte zu diesem Ziel wurden mittels StarGate<sup>®</sup> Klonierung durchgeführt (siehe 2.2.13.).

#### 3.1.2.1. Donorvektor-Klonierung der variablen Regionen $V_{H\text{ PC61}}$ , $V_{H\text{ GK1.5}}$ , $V_{L\lambda\text{ PC61}}$ und $V_{L\kappa\text{ GK1.5}}$

In einem ersten Schritt mussten die gewonnenen Amplifikate über ihre *combinatorial sites*, welche während der PCR durch die spezifischen Primer angefügt wurden jeweils in einen pEntry-IBA 10 Donorvektor kloniert werden. Ligation einer V-Region und anschließende Hitzeschocktransformation in *E. coli* wurden nach Herstellerangaben durchgeführt, eine Bakterienkultur über Nacht inkubiert und die Plasmide anschließend mittels Isolationskit aufgereinigt. Vor jeder Verifizierung eines Klonierungsschrittes durch Sequenzanalyse erfolgte ein Test-Verdau des Plasmids mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XbaI* und *HindIII*. Durch deren Schnittstellen in beiden flankierenden Regionen um die Rekombinationsstelle eines StarGate<sup>®</sup>-Vektors, konnte das klonierte PCR-Produkt ausgeschnitten werden. Aufgereinigte Plasmide, die im Test-Verdau ein ausgeschnittenes Fragment richtiger Größe zeigten wurden sequenziert. Ein erster Klonierungsversuch in den Donorvektor pEntry Iba 10 erbrachte für die variablen Regionen gegen CD25 (von PC61) wie gegen CD4 (von GK1.5) nur teilweise die erhofften Ergebnisse. Während die gelelektrophoretische Auftrennung von  $V_{L\kappa\text{ GK1.5}}$  nach *XbaI/HindIII*-Verdau die erwarteten *Inserts* von ca. 300 bp in hoher Effizienz ergab und der Test-Verdau für  $V_{L\lambda\text{ PC61}}$  im dritten Ansatz eine schwache Bande derselben Größe zeigte (Abb. 4, \* Markierung, weißer Pfeil), erbrachte eine Analyse zu beiden schweren Ketten keine *Inserts* oder ein zumindest uneindeutiges Bandenmuster (Abb. 4, \* Markierungen). Alle aufgereinigten Plasmide der mit \* markierten Banden wurden mittels Sequenzierung und Datenbankrecherche untersucht. Wie die Analyse der Sequenzen ergab, enthielten die 300 bp-Banden von  $V_{L\kappa\text{ GK1.5}}$  und  $V_{L\lambda\text{ PC61}}$  die leichten Ketten der Antikörper gegen murines CD4 und CD25, während in beiden Plasmiden zu  $V_{H\text{ PC61}}$  keine schwere Kette bestätigt werden konnte.

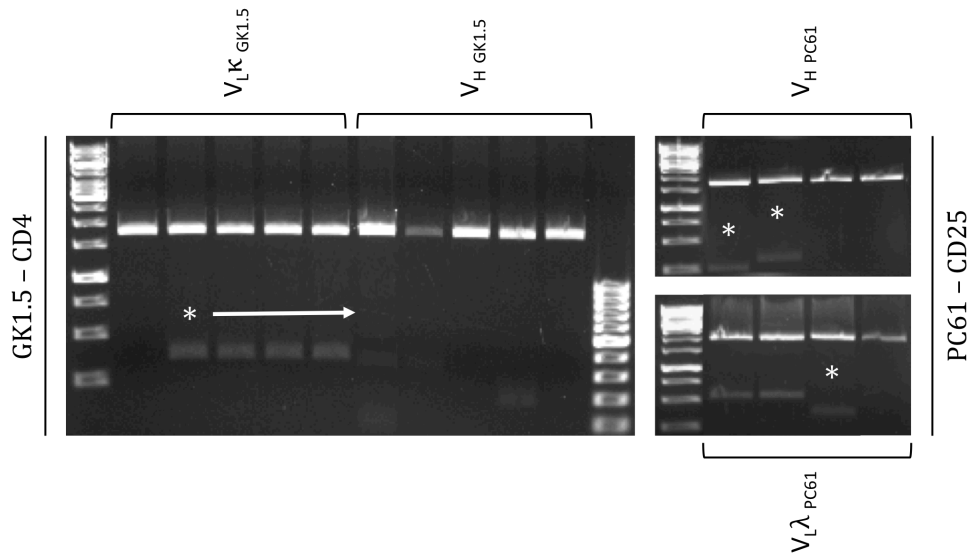


Abb. 4: Klonierung der variablen Regionen  $V_H{}_{GK1.5}$ ,  $V_L^{\kappa}{}_{GK1.5}$ ,  $V_H{}_{PC61}$  und  $V_L^{\lambda}{}_{PC61}$  gegen murines CD4 und CD25 in Donorvektor pEntry IBA 10 (StarGate®). Restriktionsendonuklease-Verdau der aufgereinigten Plasmide mittels *XbaI/HindIII*. Gelelektrophoretische Auftrennung von  $V_L^{\kappa}{}_{GK1.5}$  ergab Banden der erwarteten Länge von 300 bp, die zugehörige schwere Kette  $V_H{}_{GK1.5}$  konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Für  $V_H{}_{PC61}$  zeigten sich zwei *Inserts* im Agarose-Gel, wobei eines mit 250 bp zu kurz, das andere jedoch in erwarteter Länge erschien. Die Auftrennung von  $V_H{}_{PC61}$  schließlich erbrachte nur in einem Fall eine 300 bp Bande, ansonsten zwei Fragmente von ca. 500 bp Länge. Aufgereinigte Plasmide aller mit weißem \* (bzw. Pfeil) markierter Banden wurden mittels Sequenzanalyse und Datenbankrecherche analysiert. Nur die Sequenzen der beiden leichten Ketten konnten nachgewiesen werden. Größenstandards: 1 kb und 100 bp Gene Ruler DNA Ladder.

In weiteren Klonierungsläufen wurden Versuche unternommen, auch die V-Regionen der beiden schweren Ketten in Donorvektoren einzubringen. Zwar konnten diese nach wiederholten Ligationen und Transformationen in pEntry IBA 10 nachgewiesen werden, doch ergaben Sequenzanalysen immer wieder Deletionen in den terminalen Abschnitten. So fanden sich bei *forward* oder *reverse* Primer in Sequenzerggebnisse von  $V_H{}_{PC61}$  trunkierte Abschnitte (z.B. fehlende TCCC-*combinatorial site*) oder Primerverdopplungen, während bei  $V_H{}_{GK1.5}$  einzelne Basendeletionen am 3' -Ende des *forward* Primers auftraten. Versuche durch eine Erhöhung der *annealing* Temperatur ( $T_A = 65^\circ\text{C}$  für  $V_H{}_{GK1.5}$ ,  $T_A = 68^\circ\text{C}$  für  $V_H{}_{PC61}$ ) und Verkürzung der Amplifikationszeiten neue, spezifischere PCR-Produkte aus cDNA zu erhalten führten ebenso wenig zu einer Lösung des Problems wie eine kürzere UV-Strahlenexposition aufgetrennter Amplifikate während der Bandenexzision aus Agarose-Gelen (Daten nicht gezeigt). Versuche die Ligation in StarGate® zu optimieren, in dem vom Herstellerprotokoll abweichende Verhältnisse von PCR-Produkt zu Vektor eingesetzt wurden brachten ebenfalls nicht den erhofften Erfolg. Wegen der insgesamt geringen Effizienz der Donorvektor-Klonierung, wurde pEntry IBA 10 durch den neu entwickelten pEntry IBA 51 Vektor (siehe 2.1.9.) ersetzt, da die Vermutung bestand, geringe Mengen an Hintergrundexpression der potentiell für *E.coli* toxischen schweren Ketten könnten ein effizientes Wachstum nach Transformation verhindern. Die Effizienz der Klonierung konnte trotz alledem nicht gesteigert werden und bestehende Sequenzfehler aufgereinigter Plasmide wiederholten sich (Daten nicht gezeigt). Da beide schweren Ketten mittels herkömmlicher StarGate® Klonierung nicht fehlerfrei in einen Vektor eingebracht werden konnten, wurde ein alternativer Weg gesucht. Die V-

Region der schweren Kette  $V_{H\text{ GK1.5}}$ , welche in bisherigen Versuchen nach Klonierung die geringsten Sequenzfehler enthielt, wurde hierzu in einem ersten Schritt durch *blunt end*-Klonierung mit der einzigen Deletion einer Thymin-Base am 3'-Ende des *forward* Primers in einen pJET1.2/blunt Vektor (Fermentas) eingebracht. Mit diesem wurde nun im nächsten Schritt eine Mutagenese-PCR durchgeführt um die aufgetretene Deletion und den damit verbundenen *frameshift* zu korrigieren. Die Standard-PCR (HerculaseII DNA-Polymerase, siehe 2.2.1.2.) mit den hierfür entworfenen Primern, welche das fehlende Thymin enthielten (VetorNTI) war erfolgreich. Nach Dpn1 Verdau (siehe 2.2.8.) und Ethanol-Präzipitation (siehe 2.2.9.) wurde die mutierte Sequenz erneut transformiert und mittels Plasmid-Isolation aufgereinigt. Ein Test-Verdau mit *XbaI/HindIII* zeigte nach gelelektrophoretischer Auftrennung das zu erwartende *Insert* von ca. 450 bp Größe, bestehend aus  $V_{H\text{ GK1.5}}$  (ca. 300 bp) und den flankierenden Bereichen der *XbaI/HindIII*-Schnittstellen in pJET1.2/blunt (Abb. 5 A). Die Sequenzierung der extrahierten Banden erbrachte ein positives Ergebnis und  $V_{H\text{ GK1.5}}$  wurde ohne Abweichungen der Sequenz in pJET1.2/blunt nachgewiesen. Somit musste die variable Region der schweren Ketten gegen CD4 in einem letzten Schritt aus pJET1.2/blunt in den Donorvektor pEntry IBA 51 überführt werden. Eine Standard-StarGate®-Klonierung ergab im Test-Verdau mittels *XbaI/HindIII* das erwartete 300 bp-*Insert* (Abb. 5 B), welches nach Sequenzierung als  $V_{H\text{ GK1.5}}$  verifiziert werden konnte. Die Fusionsklonierung der einzelnen Fab-Komponenten für ein reversibles Reagenz gegen murines CD4 war hierdurch möglich.

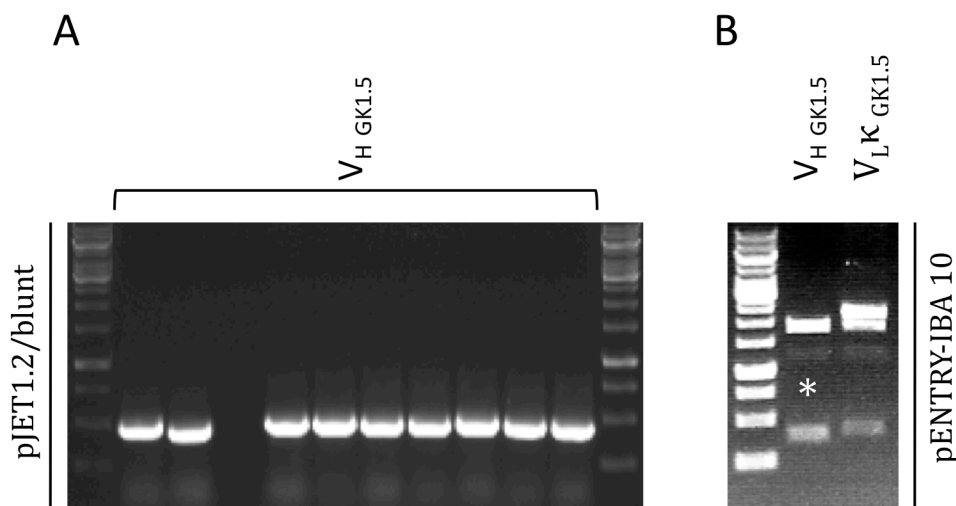


Abb. 5: Donorvektor-Klonierung der variablen Region  $V_{H\text{ GK1.5}}$  gegen murines CD4. (A) Nach *blunt end*-Klonierung in pJET1.2/blunt (Fermentas), Mutagenese-PCR auf Grund einer Deletion in der Sequenz des *forward* Primers, erneuter Transformation und Plasmid-Aufreinigung; Test-Verdau mittels *XbaI/HindIII* (dargestellt). Gelelektrophoretische Auftrennung ergab Banden erwarteter Länge in hoher Effizienz: 450 bp bestehend aus  $V_{H\text{ GK1.5}}$  (ca. 300 bp) + flankierende Sequenzen der *XbaI/HindIII*-Schnittstellen (ca. 150 bp). Sequenzierung nach Gelextraktion ergab korrekte Sequenz von  $V_{H\text{ GK1.5}}$ . (B) Überführung von  $V_{H\text{ GK1.5}}$  aus pJET1.2/blunt in pEntry IBA 51 (StarGate®). Bild einer Agarose-Gelelektrophorese nach Plasmidaufreinigung und *XbaI/HindIII*-Verdau zeigte ein *Insert* zu erwartender Länge (300 bp). Positiv-Kontrolle: bereits bestätigte Klonierung von  $V_{L\text{ K GK1.5}}$  (siehe Abb. 4). Sequenzergebnis und Datenbankanalyse des im Gel aufgetrennten, mit \* markierten Plasmids ergaben die fehlerfreie Sequenz von  $V_{H\text{ GK1.5}}$ . Größenstandard: Gene Ruler 1kb DNA Ladder.

### 3.1.2.2. Gen-Synthese der variablen Regionen $V_{H\text{ PC61}}$ und $V_L\lambda_{\text{ PC61}}$

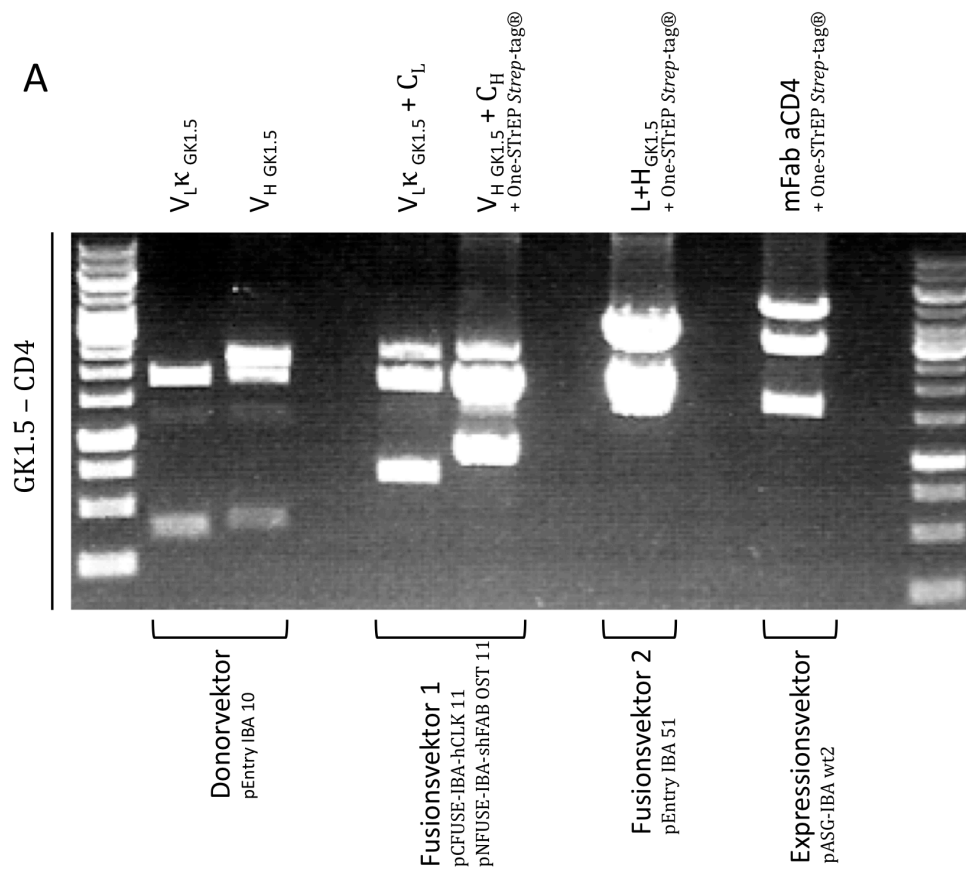
Aufgrund beschriebener methodischer Schwierigkeiten während der Donorvektor-Klonierung des anti-CD4 Fab-Fragments wurde für das Konstrukt gegen CD25 eine Alternative evaluiert. Die Sequenzen der variablen Regionen von schwerer und leichter Kette, deren exakte Basenabfolge durch die erläuterten Klonierungsversuche bereits bekannt war – für  $V_L\lambda_{\text{ PC61}}$  vollständig, für  $V_{H\text{ PC61}}$  mit genannten Deletionen, Insertionen oder trunkierten Primerabschnitten – wurden durch Gen-Synthese generiert und direkt in den Donorvektor pEntry IBA 51 eingefügt (GeneArt). Nach erfolgreicher Synthese war es nun auch möglich mit Fusionsklonierungen für eine Zusammenführung der Komponenten des anti-CD25 Fabs zu beginnen.

### 3.1.2.3. Zusammenführung von schwerer Kette ( $V_H + C_H$ ), *Strep-tag*<sup>®</sup> und leichter Kette ( $V_L + C_L$ ) gegen CD4 und CD25 durch Fusionsklonierungen

In diesem Schritt wurden die klonierten variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L\kappa$  bzw.  $V_L\lambda$  mit zugehörigen konstanten Regionen der schweren ( $C_H + \text{One-STrEP } \textit{Strep-tag}^{\circ}$ ) und leichten Kette ( $C_L$ ), welche bereits in den jeweiligen Fusionsvektoren von StarGate<sup>®</sup> enthalten waren fusioniert. In einer Fusionsklonierung 1. Ordnung erfolgte die Überführung von  $V_L$  aus dem Donorvektor in den Fusionsvektor pCFUSE-IBA-hCLK 11, welcher  $C_L$  enthielt und analog hierzu die Übertragung von  $V_H$  aus dem Donorvektor in den pNFUSE-IBA-shFAB OST 11, der  $C_H + \text{One-STrEP } \textit{Strep-tag}^{\circ}$  beinhaltete. Die Fusionsklonierung 2. Ordnung diente im Folgenden dazu die beiden Konstrukte ( $V_L + C_L$ ) und ( $V_H + C_H + \text{One-STrEP } \textit{Strep-tag}^{\circ}$ ) in einem neuen Donorvektor zusammenzuführen um sie von dort in einem letzten Schritt in den Expressionsvektor für *E.coli* (pASG-IBA wt2) zu klonieren. Jeder Klonierungsschritt wurde durch Test-Verdau mit *XbaI/HindIII* untersucht. Plasmide, welche laut gelelektrophoretischer Auftrennung ein *Insert* zu erwartender Größe enthielten, wurden mittels Sequenzierung und Datenbankanalyse verifiziert. Für eine vergleichende Übersicht aller Klonierungsschritte (Abb. 6 A) wurde, beispielhaft für die Generierung des murinen Fabs anti-CD4, mit entsprechenden Plasmiden ein *XbaI/HindIII*-Restriktionsverdau wiederholt. Die Auftrennung im Agarose-Gel zeigte für die bereits beschriebene Donorvektor-Klonierung zwei *Inserts* von je 300 bp Länge, die als V-Regionen  $V_{H\text{ GK1.5}}$  und  $V_{L\kappa\text{ GK1.5}}$  identifiziert wurden. Die Fusionsklonierung 1. Ordnung erbrachte für schwere und leichte Kette verschiedene Bandenmuster. Während das exzidierte Fragment bestehend aus  $V_{L\kappa\text{ GK1.5}}$  (ca. 300 bp) und  $C_L$  (ca. 300 bp) inklusive der flankierenden Bereiche der Schnittstellen eine Größe 600 – 700 bp erreichte, zeigte sich für das Fragment der schweren Kette, mit  $V_{H\text{ GK1.5}}$  (ca. 300 bp),  $C_H$  (ca. 300 bp), One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> (ca. 70 bp), Shine Dalgarno Sequenz und flankierenden Bereiche von *XbaI/HindIII* eine Größe von knapp 800 bp. In beiden Fällen erschien in der Auftrennung verbliebene geschnittene Vektorsequenz von ca. 1800 bp Länge. Nach der Fusionsklonierung 2. Ordnung ergab die



Auftrennung des Test-Verdaus, neben unverdaulichem Vektor (ca. 3400 bp) wie zu erwarten ein einziges *Insert* von ca. 1600 bp Länge ( $V_L + C_L$  und  $V_H + C_H + \text{One-STrEP Strep-tag}^\circ$ ), welches auch nach Klonierung in den Expressionsvektor pASG-IBA wt2 erhalten blieb. Die beiden hier ebenfalls deutlichen größeren Banden entsprachen verbliebener geschnittener Vektorsequenz (ca. 3200 bp) bzw. unverdaulichem *Template* (ca. 5000 bp). (Abb. 6 A) In analoger Weise wurde die Fusionsklonierung der anti-CD25 Fab-Komponenten – nach Synthese der V-Regionen in pEntry IBA Vektoren – durchgeführt und verifiziert. Die Ergebnisse wurden in einer Übersicht (Abb. 6 B) den oben für anti-CD4 beschriebenen gegenübergestellt. Nach endgültiger Verifizierung aller klonierten Sequenzen mit deren korrekter Orientierung in pASG-IBA wt2 und fehlerfreier Basenabfolge, konnten die beiden ersten murinen Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteine, mFab anti-CD4 und anti-CD25 exprimiert werden.



B

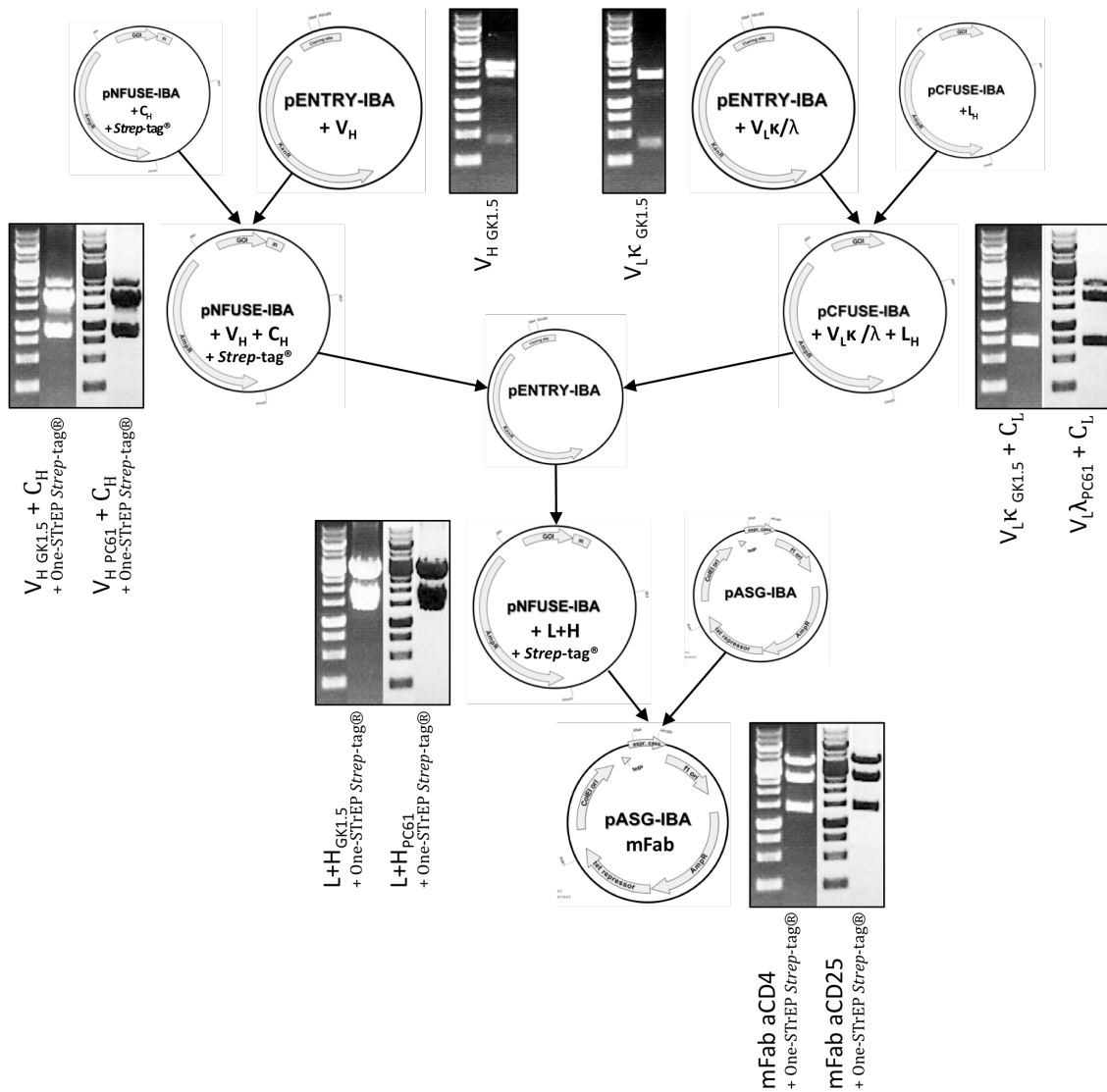


Abb. 6: Fusionsklonierungen der einzelnen Fab-Komponenten für die Herstellung muriner Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteine gegen CD4 und CD25. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung nach *XbaI/HindIII*-Restriktion einer Zusammenschau aller im Zuge der Fusionsklonierung erzeugten Vektorkonstrukte für murines anti-CD4. Das Agarose-Gel zeigt nach Donorvektor-Klonierung zwei *Inserts* zu erwartender Größe (300 bp), welche als V<sub>H</sub> GK1.5 und V<sub>L</sub> K GK1.5 identifiziert wurden (siehe Abb. 5). Fusionsklonierung 1. Ordnung – leichte Kette (600 – 700 bp): V<sub>L</sub> K GK1.5 (ca. 300 bp) + C<sub>L</sub> (ca. 300 bp) + flankierende Bereiche der Schnittstellen – schwere Kette (ca. 800 bp): V<sub>H</sub> GK1.5 (ca. 300 bp) + C<sub>H</sub> (ca. 300 bp) + One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> (ca. 70 bp) + Shine Dalgarno + flankierende Bereiche der Schnittstellen. In beiden Fällen weitere große Bande: jeweils verbliebener geschnittener Vektorsequenzen (ca. 1800 bp). Fusionsklonierung 2. Ordnung: *Insert* (V<sub>L</sub> + C<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> + C<sub>H</sub> + One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup>, ca. 1600 bp), unverdaute Vektorsequenz (ca. 3400 bp). Klonierung in Expressionsvektor pASG-IBA wt2: gleiches *Insert* (ca. 1600 bp), verbliebene geschnittene Vektorsequenz (ca. 3200 bp), unverdautes *Template* (ca. 5000 bp). (B) Übersicht des Prinzips einer StarGate<sup>®</sup> Fusionsklonierung mit Gegenüberstellung der Ergebnisse für anti-CD4 (schwarz-weiß) und anti-CD25 (weiß-schwarz) Fab-Komponenten nach *XbaI/HindIII*-Verdau aufgereinigter Plasmide (Abbildungen der Plasmide modifiziert nach StarGate<sup>®</sup> Vektorkarten, <http://www.iba-go.com>). Alle Plasmide, die dargestellte *Inserts* von erwarteter Größe enthielten, wurden mittels Sequenzierung und Datenbankanalyse verifiziert. Größenstandard: Gene Ruler 1kb DNA Ladder.

### 3.1.3. Periplasmatische Expression der anti-CD4 und anti-CD25 Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteine

Nach erfolgreicher Klonierung der murinen Fab-Fragmente (mFabs) anti-CD4 und anti-CD25 in den finalen Expressionsvektor pASG-IBA wt2 und Transformation (siehe 2.2.10.) in elektrokompente *E. coli* (Stamm: JM83) folgte die periplasmatische Proteinexpression der beiden Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteine. (siehe 2.4.2.) Nach Aufreinigung der so exprimierten mFabs mittels *Strep tag*<sup>®</sup>-*Strep-Tactin* Affinitätschromatographie (*Strep-Tactin*<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup>, siehe 2.4.3.) und Umpufferung der Eluate wurden Vollständigkeit und Reinheit der Expression proteinchemisch durch Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Analyse in Western Blot bzw. Silberfärbung untersucht. Das elektrophoretisch aufgetrennte Ganzzelllysate zeigte im Western Blot nach Behandlung mit *StrepMAB* anti-*Strep-tag*<sup>®</sup> Antikörper (Primärantikörper, IBA) und einem mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper für beide mFab Fusionsproteine eine distinkte Bande von ca. 26 kDa – der erwarteten Größe der schweren Kette (Abb. 7 A). Zur Analyse des aufgereinigten Fab-Fragments hinsichtlich der Vollständigkeit beider Ketten sowie der Reinheit des erhaltenen Produktes wurde eine Silberfärbung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Expression angefertigt. Hier zeigte sich in beiden Aufreinigungen eine deutliche Hauptbande von ca. 27 kDa, die von einer knapp niedriger laufenden Bande begleitet wurde, womit die schwere sowie die geringfügig kleinere leichte Kette (ca. 25 kDa, kein *Strep-tag*<sup>®</sup>), ohne Degradationsprodukte oder Verunreinigung in nennenswerter Menge nachgewiesen waren (Abb. 7 B). Im Folgenden wurden die ersten Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteine anti-CD4 und anti-CD25 auf ihrer Färbeeigenschaft hin getestet.

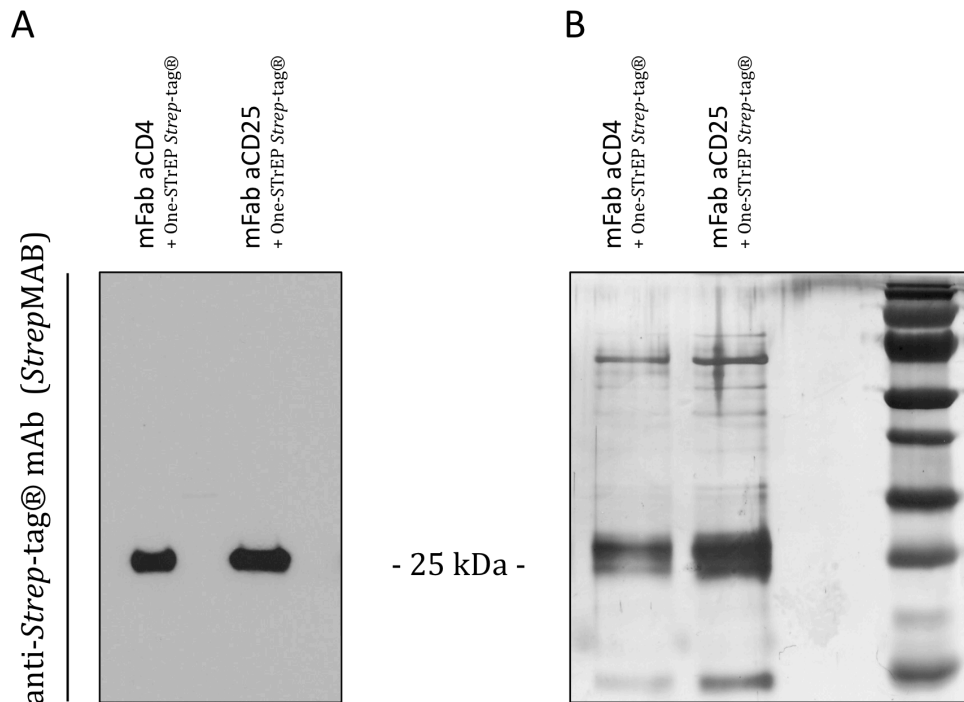


Abb. 7: Analyse von Erfolg, Reinheit und Ausbeute der periplasmatischen Expression von mFab-One-STrEP *Strep-tag*® Fusionsprotein anti-CD4 und anti-CD25 nach affinitätschromatographischer Aufreinigung über *Strep-Tactin*® Superflow® Säulen. Eluate wurde nach Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in Western Blot bzw. Silberfärbung untersucht. (A) Western Blot Analyse der beiden mFabs zeigte klare, deutliche Banden erwarteter Größe (ca. 26 kDa) nach Detektion der *Strep-tag*® konjugierten schweren Kette von anti-CD4 bzw. anti-CD25 mittels *StrepMAB* anti-*Strep-tag*® Primärantikörper und Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper. (B) Silberfärbung zeigte deutliche Doppelbanden bei ca. 25 - 27 kDa (schwere über geringfügig kleinerer leichter Kette ohne *Strep-tag*®) und nur geringe Kontamination mit anderen Proteinen. Größenstandard: *PageRuler*™ Plus Prestained Proteinladder

### 3.2. TEST MURINER FAB-STREPTAMERE IN FACS-FÄRBUNG UND ZELLSORTIERUNG

Um der Anwendung reversibler Färbereagenzien für Gewinnung sowie *in vitro* und *in vivo* Verwendung muriner nTregs näher zu kommen, bedurfte es zum Einen der Überprüfung von Färbereigenschaften und Spezifität der neuen Fab-*Streptamere*. Daneben aber musste ein sicherer Nachweis über die Ablösbarkeit und Reversibilität der Färbungen erbracht und deren praktikable Anwendbarkeit bei Isolierung von nTregs mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung gezeigt werden. Hierzu wurden nach Klonierung und periplasmatischer Expression der Fab-One-*Strep Strep-tag*® Fusionsproteine anti-CD4 und anti-CD25 die im Folgenden gezeigten Versuche durchgeführt.

#### 3.2.1. Erste Titration und Einzelfärbung mittels anti-CD4 und anti-CD25

Nach proteinbiochemischen Charakterisierung der klonierten mFab-*Streptamere*, sollte zu allererst ihre Funktionalität durchflusszytometrisch überprüft werden um zu sehen, ob eine Färbung möglich war.

Für Einzelfärbungen mit anti-CD4 bzw. anti-CD25 wurden Lymphozyten aus Milzen und Lymphknoten naiver *C57BL/6* Mäuse isoliert. Die aufgereinigten mFab Reagenzien wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration (NanoDrop®) mit *Strep*-Tactin PE multimerisiert (siehe 2.5.1.) und in einfachen Ansätzen (für  $5 \times 10^6$  in 96-well Platten) zur Färbung der Zellen verwendet. Um Intensität und Charakteristik der mFab-Färbung mit konventionellen mAb-Färbungen vergleichen zu können und die optimale Menge an Färbereagenz zu bestimmen, wurden für anti-CD4 (0,15 µg/µl) und anti-CD25 (0,28 µg/µl) als erstes Titrationsreihen von 0,05 bis 1,0 µg mFab bei festgelegter Menge *Strep*-Tactin PE angefertigt. Zur Anfärbung aller T-Lymphozyten und praktikableren Darstellung der Ergebnisse, wurden alle Proben hierbei zusätzlich mit aCD3 APC bzw. PB (mAb) gefärbt. Als Referenz dienten jeweils konventionelle Antikörper derselben Fluoreszenzkonjugation. Sowohl für mFab anti-CD4 (Abb. 8 A) wie auch für anti-CD25 (Abb. 8 B) zeigte sich eine der Titration entsprechende Zunahme der Färbeintensität bis hin zu völliger Vergleichbarkeit mit dem Referenzantikörper aCD4 bzw. aCD25. Distinkte, klar abzugrenzende Positiv-Populationen konnten mit beiden Fab-Reagenzien sichtbar gemacht werden. Die abgebildeten *dot plots* zeigen die Färbung nach *pregating* auf aCD3. Eine vergleichende Histogramm-Darstellung veranschaulicht die Intensitätszunahme mit steigender Menge an eingesetztem mFab. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die ersten murinen Fab-*Streptamere* Zellen erfolgreich anfärben konnten und den Vergleich mit konventionellen Antikörpern bestehen würden.

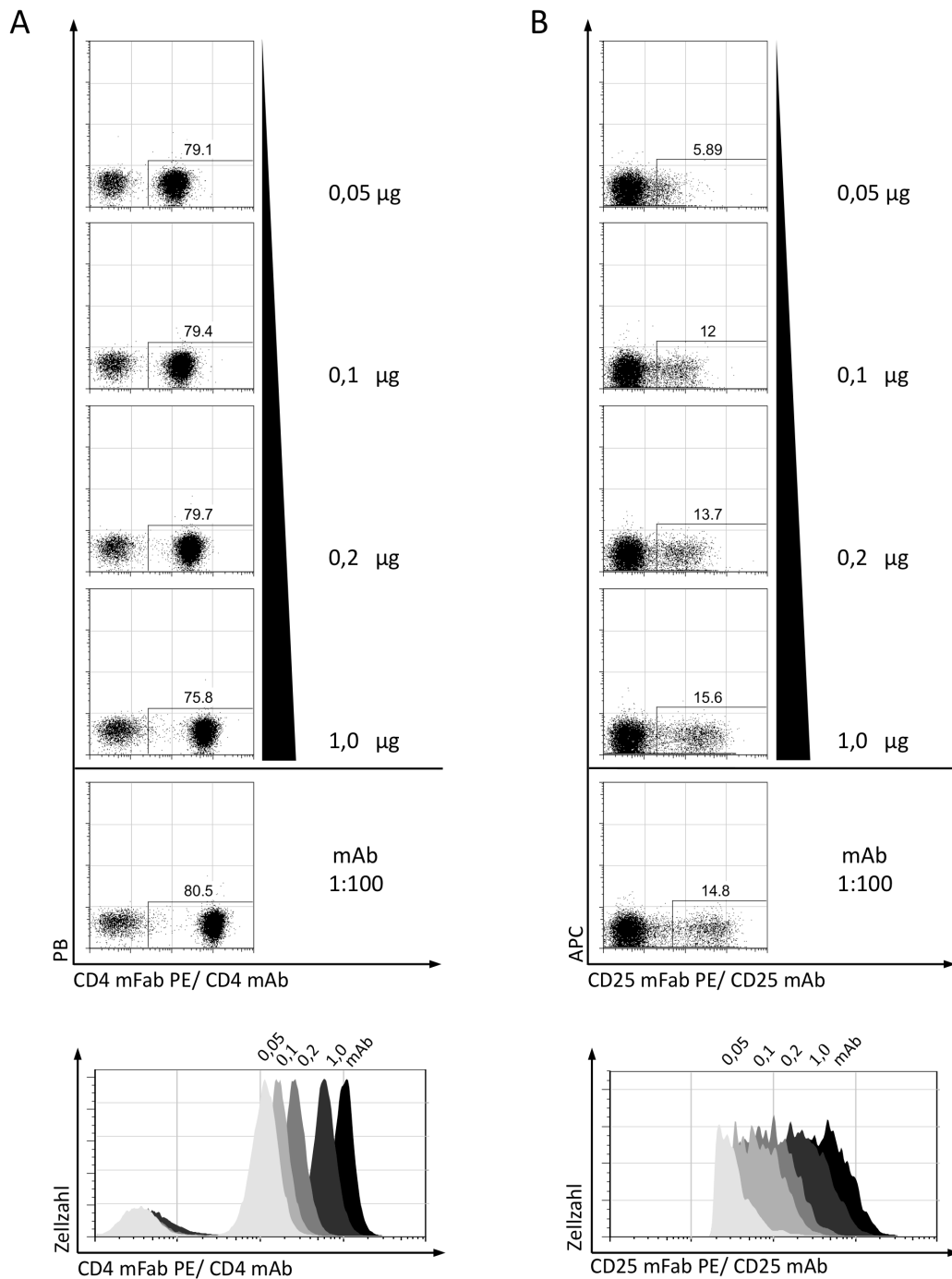


Abb. 8: Testfärbung und Titration der beiden murinen Fab-*Streptamere* (mFab) anti-CD4 und anti-CD25. Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten naiver C57/BL6 Mäuse wurden zu je  $5 \times 10^6$  (96 well Platte) mit einfachen mFab-Multimer Ansätzen ( $0,75 \mu\text{g}$  *Strep*-Tactin PE +  $x \mu\text{g}$  mFab) bzw. aCD4 oder aCD25 PE Referenzantikörpern (1:100, identischer Klon) gefärbt. Eine Titrationsreihe ( $0,05 - 0,1 - 0,2 - 1,0 \mu\text{g}$ ) mit Multimeransätzen variabler mFab Menge bei festgelegtem *Strep*-Tactin PE wurde für beide Reagenzien durchgeführt. Zusätzliche Behandlung aller Proben mit aCD3. *Dot plots* zeigen die gefärbten Zellen nach *pregating* auf aCD3, aufgetragen gegen einen dritten ungefärbten Kanal (PB bzw. APC). Eine *overlay*-Histogramm-Darstellung verdeutlicht die Intensitätszunahme der Färbung mit steigender Menge an mFab. (A) zeigt die Ergebnisse für anti-CD4 bei *pregating* auf aCD3 APC, (B) analog für die Daten für anti-CD25 bei *pregating* auf aCD3 PB.

### 3.2.2. Ablöse-Tests mit anti-CD4 und anti-CD25 mFab-*Streptameren*

Nachdem erste Testfärbungen die prinzipielle Funktionalität der Reagenzien gezeigt hatten, sollte nun die Kerneigenschaft der Fab-*Streptamere*, ihre Ablösbarkeit untersucht werden. Gemäß des Prinzips reversibler Multimerfärbungen besaß ein monomeres Fab-Molekül alleine eine zu geringe Affinität zu seinem Antigen, wodurch eine stabile Bindung ausschließlich im multimerisierten Zustand möglich war. Eine Auflösung der Multimerkomplexe durch Zugabe von kompetitivem D-Biotin sollte somit zu einer spontanen Abdissoziation der Fab-Monomere von der Zelloberfläche führen und die Zelle damit „unberührt“ zurücklassen bzw. eine erneute Anfärbung ermöglichen. Um dieses Prinzip an den neu entwickelten murinen Fab-*Streptameren* anti-CD4 und anti-CD25 zu untersuchen, wurde ein standardisiertes Ablöseexperiment durchgeführt, welches sowohl die Auflösung der Multimerkomplexe mittels D-Biotin als auch eventuelle Monomer-Rückstände auf den Zellen nachweisen konnte (siehe 2.5.2.2.). Für anti-CD4 wurde analog zu der in 3.2.1. erläuterten Titration eine Färbung mit aCD3 APC (mAb) und dem mFab anti-CD4 PE durchgeführt – hier allerdings in großem Volumen (3-facher Multimeransatz,  $1,5 \times 10^7$  Zellen in 15 ml-Röhrchen). Bei der Menge an mFab wurde gemäß der Titrationsergebnisse ein Kompromiss aus Färbeintensität und Reagenzienverbrauch gesucht, weshalb man mit 0,2 µg pro einfachem Ansatz fortfuhr. Das Ergebnis des Ablöseexperiments für anti-CD4 (Abb. 9 A) zeigte eine klare, mit dem konventionellen aCD4 Antikörper vergleichbare Färbung, die durch Zugabe von D-Biotin vollständig eliminiert werden konnte. Eine Nachfärbung mit *Strep*-Tactin PE zeigte keinerlei Signal, wodurch eine Abdissoziation der Fab-Monomere von den Zelloberflächen als erwiesen gelten konnte. Die positive zweite Multimerfärbung zeigte – verglichen mit der ersten – eine noch besserer Qualität und höherer Frequenzen, was vermutlich auf eine längere Inkubationszeit der Färbung von 30 statt 20 min zurückgeführt werden kann. Dies schloss mögliche Rückstände an D-Biotin aus und verdeutlichte zusätzlich die Reversibilität der Färbung. Das murine Fab-*Streptamer* anti-CD4 konnte somit als funktionell und reversibel angesehen werden.

Dass ein direkter Nachweis der Ablösbarkeit bei nicht-modifizierten Fab-*Streptamers* nicht immer erbracht werden kann, zeigte der analoge Versuch mit anti-CD25. Auch hier wurde das standardisierte Ablöseprotokoll durchgeführt, wobei neben der Multimerfärbung (0,2 µg mFab anti-CD25) statt aCD3 Antikörper mAb aCD4 PB verwendet wurde um regulatorische T-Zellen zu detektieren (Abb. 9 B). Die Färbung zeigte eine klar abgrenzbare doppelt-positive Population in einer zur CD4 CD25 mAb Färbung äquivalenten Qualität. Durch Zugabe von D-Biotin konnte die mFab anti-CD25 PE Färbung vollkommen aufgehoben werden, jedoch erbrachte die Nachfärbung mit *Strep*-Tactin PE ein nahezu wiederhergestelltes Färbemuster mit nur geringfügig verminderter Intensität des PE-Signals. In diesem Fall konnte der Multimerkomplex zwar durch D-Biotin aufgelöst werden, was als Hinweis auf eine prinzipielle Funktionalität des mFabs oder zumindest des *Strep*-tag® gewertet wurde, doch schien die Affinität der einzelnen Fab-Monomer zu hoch für eine spontane Dissoziation von CD25. Um auch für

das zweite mFab Ablösbarkeit zu erreichen, mussten weitere Schritte unternommen werden, die Bindungseigenschaften des Reagenz zu modifizieren.

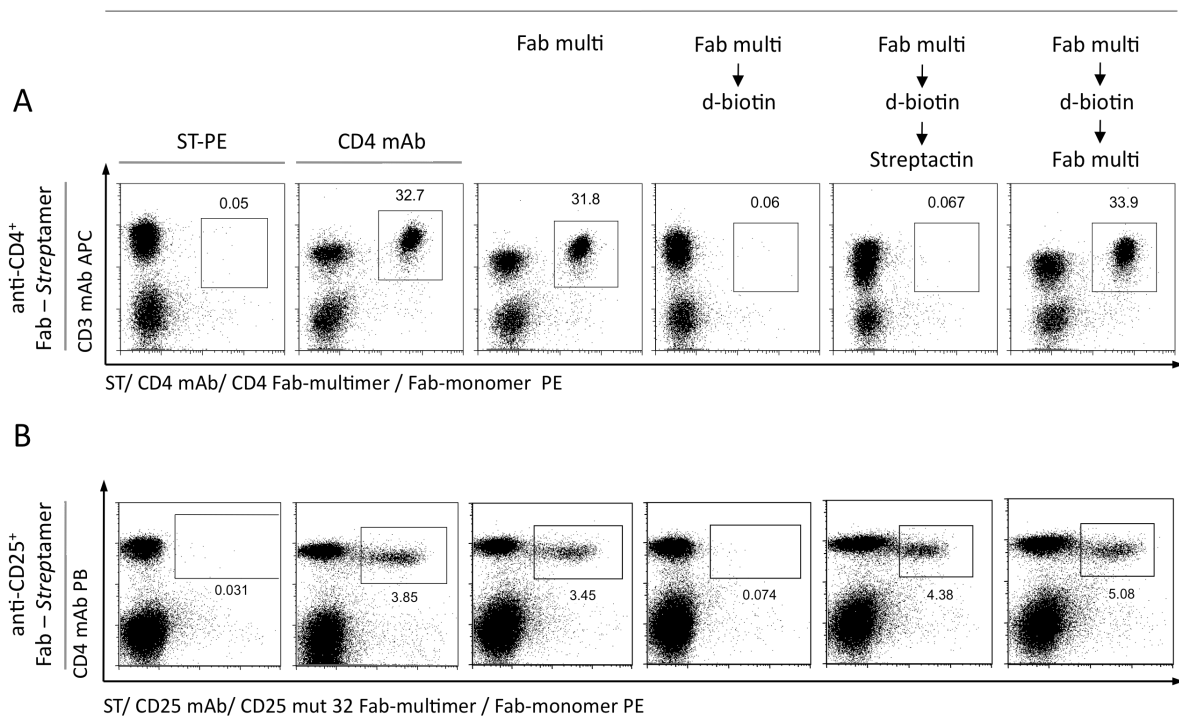


Abb. 9: Standardisiertes Ablöseexperiment zum Nachweis der Reversibilität einer mFab-Streptamer Färbung. Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten naiver C57/BL6 Mäuse wurden zu je  $1,5 \times 10^7$  Zellen (15 ml-Röhrchen) mit 3-fachem Multimeransatz und  $0,2 \mu\text{g}$  mFab pro einfachem Ansatz gefärbt. (A) Ergebnisse des Ablöseexperimentes für anti-CD4: Ermittlung des PE-Hintergrundsignals durch unspezifische Bindung von *Strep*-Tactin PE. Referenzfärbung mit mAb CD4 PE. Multimerfärbung mittels mFab CD4 PE in vergleichbarer Qualität. Elimination des PE Signals nach Auflösung der Multimere durch Zugabe von D-Biotin. Nachfärbung mit *Strep*-Tactin PE zur Detektion eventueller Monomer-Rückstände auf den Zellen blieb negativ. Zweite Multimerfärbung zum Ausschluss etwaiger D-Biotin-Rückstände verdeutlichte die Reversibilität der Färbung. (B) Analog zu oben, das Ablöseexperiment für anti-CD25: Doppelfärbung mittels mFab Multimer anti-CD25 PE und aCD4 PB mAb zeigte eine distinkte doppelt-positive Population an regulatorischen T-Zellen in äquivalenter Qualität zu Referenzfärbung mittels mAb CD4 PB CD25 PE. Eine Auflösung des Multimerkonstrukts durch Zugabe von D-Biotin führte zur Elimination des PE-Signals, der Nachweis gebundener Fab-Monomer blieb jedoch positiv und ließ auf eine zu hohe Affinität des mFabs anti-CD25 schließen.

### 3.2.3. Mutationen in der Aminosäuresequenz für Entwurf und Herstellung eines affinitätsmodifizierten, reversiblen anti-CD25 mFab-Streptamers

Aus Erfahrungen mit der zur selben Zeit ebenfalls entstehenden Palette an humanen Fab-Streptameren war zu erwarten, dass nur ungefähr ein knappes Drittel aller bis dahin hergestellten Fab-Reagenzien ohne weitere Modifikation eine für reversible Färbungen ausreichend niedrige Monomer-Affinität zeigen würde. Bei allen weiteren Reagenzien musste die Bindungsstärke durch strukturelle Änderungen mit Hilfe von Austausch in der Aminosäuresequenz der Fabs verringert werden. Hierzu wurden spezifische Substitutionsmutationen innerhalb der CDRs oder an deren Rändern – in den sogenannten *framework regions* (FR) – der variablen Regionen schwerer ( $V_H$ ) bzw. leichter Kette ( $V_L$ ) eingeführt um



über die Herbeiführung einer Tertiärstrukturänderung auch die Antigenbindung der Fabs zu destabilisieren. Demnach war es Zufall, dass gerade das erste murine Fab-Streptamer anti-CD4 keine derartigen Modifikationen benötigte. Die nun für mFab anti-CD25 ausgewählten Positionen zu Basenaustausch-Mutationen ergaben sich einerseits auf der Basis publizierter SPR (*surface plasmon resonance*)-Spektroskopie Daten rekombinanter anti-CD4 Antikörper (Bes 2003), andererseits aus Erfahrungen mit erfolgreich modifizierten humanen Fab-Fragmenten (Stemberger et al. 2012). Dennoch bedurfte es, wie auch bei letzteren mehrerer Versuche, ehe eine Mutation gefunden wurde, die den erhofften Effekt der Affinitätsreduktion bewirkte. So wurde in zahlreichen Experimenten versucht, per Mutagenese-PCR (Primer siehe 2.1.8.) und Mutationen an den Positionen 35 und 94 (V<sub>L</sub>) bzw. 107 und 108 (V<sub>H</sub>) im Expressionsvektor von anti-CD25 (pASG-IBA wt2) eine Verringerung der Affinität zu erreichen, doch zeigten diese Mutanten nach Expression, Aufreinigung und anschließenden Ablösetests allesamt zwar vergleichbare Färbeeigenschaften, aber keine Reversibilität (Abb. 10 A). Die Ergebnisse ähnelten den bereits erläuterten (siehe Abb. 9 B). Eine Kombination von Basenaustauschen an zwei oder mehreren Positionen wurde nicht versucht, da diese bereits bei den humanen Fab-Reagenzien in vielen Fällen zu einem vollständigen Verlust der Färbeeigenschaften geführt hatte. Schließlich war es ein Tyrosin zu Alanin -Austausch an Position 32 (V<sub>L</sub>, Primer siehe 2.1.8.) innerhalb der CDR1 der variablen Region der leichten Kette (Abb. 10 A), welcher den gewünschten Effekt erzielte. Das zugehörige Ablöseexperiment (Abb. 10 B) zeigte nach Färbung mittels aCD4 PB Antikörper und mFab anti-CD25 mut 32 PE eine klar abgrenzbare doppelt-positive Population an regulatorischen T-Zellen, die in Frequenz und Färbemuster mit der CD4 CD25 Antikörperfärbung vergleichbar war – wenn auch die Intensität im Vergleich zum unmodifizierten Reagenz etwas verringert schien. Die Zugabe von D-Biotin eliminierte das PE-Signal vollständig und der Nachfärbetest mittels *Strep*-Tactin PE bleibt negativ. Damit wurden keine verbliebenen Fab-Monomere auf den Zelloberflächen detektiert und das Fab-*Streptamer* anti-CD25 mut 32 als reversibel betrachtet.

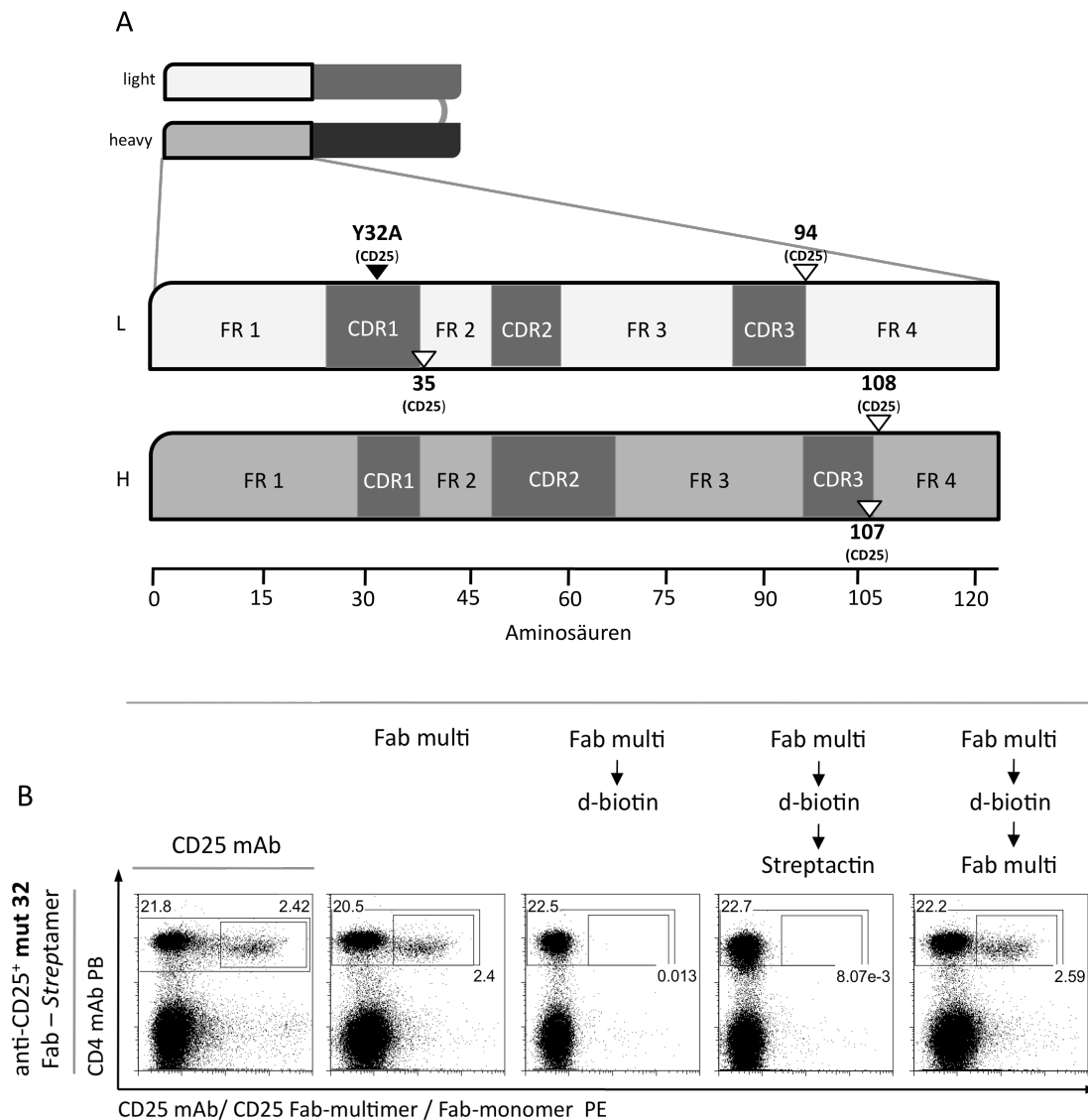


Abb. 10: Schematische Übersicht und Ergebnisse zur Generierung eines affinitätsmodifizierten reversiblen Fab-*Streptamers* anti-CD25 mittels Substitutionsmutationen innerhalb der variablen Regionen. (A) Schematische Darstellung eines Fabs mit Detailansicht der variablen Regionen. Mutagenese-PCRs im Expressionsvektor (pASG-IBA wt2) ermöglichten die Einführung von Aminosäureaustauschen an den Positionen 32, 35, 94, 107 und 108. Bis auf Y32A (Austausch von Tyrosin durch Alanin) blieben alle dargestellten Mutationen für die Ablösbarkeit der im Anschluss exprimierten und getesteten Fabs ohne den gewünschten Effekt. (B) mFab anti-CD25 mut 32 wurde mittels standardisiertem Ablöseexperiment auf Reversibilität überprüft: Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten naiver C57/BL6 Mäuse wurden zu je  $1,5 \times 10^7$  Zellen (15 ml-Röhrchen) mit 3-fachem Multimeransatz und  $0,2 \mu\text{g}$  mFab pro einfachem Ansatz gefärbt. Eine Doppelfärbung mittels mFab anti-CD25 mut 32 PE und aCD4 PB mAb zeigte eine distinkte doppelt-positive Population an regulatorischen T-Zellen in äquivalenter Qualität zur Referenzfärbung mittels mAb CD4 PB CD25 PE. Die Auflösung des Multimerkonstrukts mittels D-Biotin führte zum Verlust des PE-Signals. Die Nachfärbung mit *Strep*-Tactin PE zur Detektion eventueller Monomer-Rückstände auf den Zellen blieb negativ. Eine zweite Multimerfärbung zum Ausschluss etwaiger D-Biotin-Rückstände verdeutlichte die Reversibilität der Färbung.

### 3.2.4. mFab Doppelfärbung – Charakteristika von multiplen *Streptamer*-Färbungen mit murinem anti-CD4 und anti-CD25

Nachdem sich beide mFab Reagenzien als funktionell erwiesen hatten, konnten anti-CD4 und anti-CD25 in einer gemeinsamen *Streptamer*-Färbung kombiniert werden um somit der Idee einer schonenden Isolierung regulatorischer T Zellen durch reversible Färbung einen Schritt näher zu kommen. Vor einer Verwendung der mFabs für Zellsortierungen, musste jedoch das Verhalten der Fab-*Streptamere* in Doppelfärbungen untersucht werden. Da erste Versuche einer gemeinsamen Multimerfärbung mit mFab anti-CD4 und anti-CD25 keine oder im Vergleich zu Antikörperfärbungen schwächere Färberesultate erbrachten hatten, stellte sich die Frage, inwieweit eine Interaktion zwischen verschiedenen *Streptamer*komplexen innerhalb eines gemeinsamen Inkubationsvolumens möglich oder wahrscheinlich war. Der denkbare Austausch von Fab-Fragmenten unterschiedlicher Spezifität zwischen den einzelnen *Streptamer*komplexen konnte in einer Verringerung der Färbeintensität und –spezifität resultieren bzw. auch die Ablösbarkeit beeinträchtigen. Erste Experimente hierzu machten zumindest deutlich, dass mFab Doppelfärbungen in ihrem Ergebnis viel stärker als Einzelfärbungen mit der Anzahl an Waschsritten, dem Färbevolumen oder gar der Reihenfolge der zugegebenen mFabs bzw. der konjugierten *Streptamere* schwankten, die Färbequalität im Wesentlichen jedoch davon abhing, ob die Färbung parallel oder sequentiell – durch Waschschriffe getrennt – erfolgte. Nur in letzterem Fall konnte durch das Waschen zwischen den Färbeschriffen überschüssiges Reagenz aus der Probe entfernt und so eine Interaktion ungebundener *Streptamere* verschiedener Antigen-spezifitäten verhindert werden. Wurde bei einer Doppelfärbung in großem Volumen ( $1,5 \times 10^7$  Zellen, 15 ml-Röhrchen, siehe 2.5.2.1.) nur ein Waschschriff (10 ml in kaltem FACS-Puffer) zwischen der Zugabe des ersten und zweiten mFabs durchgeführt, konnte die Färbung durch die Reihenfolge der mFab-Zugabe beeinträchtigt werden. So war das Ergebnis der Doppelfärbung besser, wenn statt mFab anti-CD4 APC zuerst das PE-konjugierte anti-CD25 mut 32 zu den Zellen gegeben wurde. Trotzdem blieb die Färbequalität auch hier hinter der Referenzfärbung CD4 CD25 mAb zurück (Abb. 11 A, oberer Reihe). Wurde dieselbe Färbung mit drei trennenden Waschschriffen durchgeführt, waren die Ergebnisse der Färbung bei beiden Reihenfolgen wesentlich besser, wobei jedoch auch hier die Probe, welche zuerst mit anti-CD25 mut 32 PE versetzt wurde, in Frequenz und Abgrenzbarkeit der doppelt-positiven Zellen einer Antikörperfärbung am nächsten schien (Abb. 11 A, untere Reihe). Insgesamt erzielten die mFab Doppelfärbungen verglichen mit den CD4 CD25 mAb Färbungen geringfügig schwächere Färberesultate, obwohl als Einzelfärbung jeweils mit dem Antikörper äquivalent. Um dies genauer zu untersuchen, wurden mFab Doppelfärbungen, Antikörperfärbungen und gemischte mFab-Antikörperfärbungen miteinander verglichen (Abb. 11 B). Neben Kontrollfärbungen mit *Strep*-Tactin PE und APC zur Quantifizierung des jeweiligen unspezifischen Hintergrundsignals diente eine CD4 CD25 mAb Färbung als Referenz. Die doppelt-positive Population an regulatorischen T Zellen ließ sich in typischer Frequenz klar von den anderen Zellen abgrenzen (Abb. 11 B, Kontrollen). Im Vergleich

dazu zeigte eine mFab Doppelfärbung vor allem ein abgeschwächtes PE Signal bei nur leicht verminderter APC Intensität. Diesem Bild am Ähnlichsten erschien die gemischte Färbung aus mFab anti-CD25 mut 32 PE und mAb aCD4 APC. Im Gegensatz dazu war die Mischung aus mFab anti-CD4 APC und mAb aCD25 PE mit der reinen Antikörperfärbung äquivalent (Abb. 11 B, rechte Spalte). Der Grund für die verminderte Intensität der Fab-*Streptamer* Doppelfärbung lag also vor allem an mFab anti-CD25 mut 32 und weniger an mFab anti-CD4. Eine abgrenzbare, distinkte Population doppelt-positiver T Zellen konnte mittels multipler Fab-*Streptamer*-Färbung dennoch erreicht werden. Bei mehreren Versuchen mit mFab Doppelfärbungen fiel auf, dass auch das Volumen in welchem die Zellen mit den Reagenzien inkubierten einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das Färberesultat zu haben schien. Titrationsexperimente in 96-well Platten wie in 15 ml-Röhrchen zeigten, dass sich mit zunehmendem Reaktionsvolumen die Färbeintensität der Doppelfärbung – insbesondere des PE Signals von anti-CD25 – erheblich verringerte. Ein *overlay*-Histogramm nach *pregating* auf mFab anti-CD4 APC verdeutlicht diese Tendenz für kleine (Abb. 11 C, obere Reihe), wie für große (Abb. 11 C, untere Reihe) Volumina. Da der Effekt vor allem die Detektion und Abgrenzung der kleineren, PE/CD25-positiven Zellpopulation erschweren konnte, wurden alle weiteren Experimente, selbst bei Zellzahlen bis  $1 \times 10^8$  in einem Volumen von max. 300  $\mu$ l durchgeführt. Die im Zuge dieser Analysen gewonnenen Färbekriterien für Doppelfärbungen mit Hilfe von mFab-*Streptameren* wurden für alle folgenden Experimente in das Standardprotokoll aufgenommen.

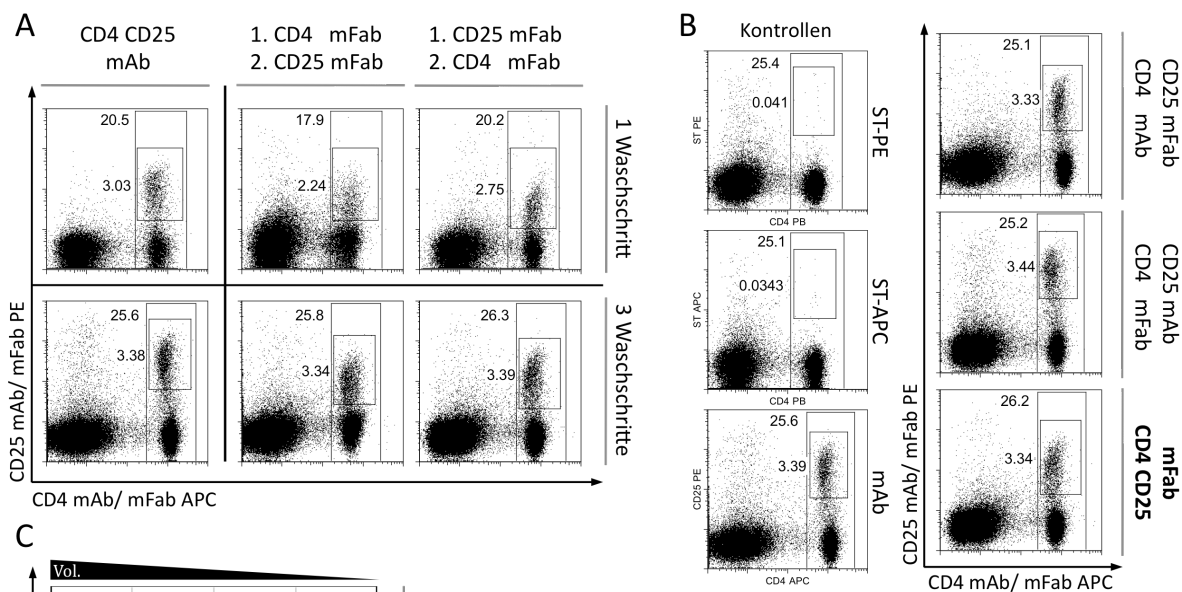


Abb. 11: Charakteristika multipler mFab-Streptamer-Färbungen. Nach ersten suboptimalen Färberesultaten bei gleichzeitiger Inkubation mit zwei mFab Reagenzien wurden Waschschriffe, Färbervolumina und die Reihenfolge der einzelnen Färbeschritte für eine Doppelfärbung mit mFab anti-CD4 und anti-CD25 optimiert. (A) Verschiedene Reihenfolgen der Zugabe an mFabs unter Trennung beider Färb-Inkubationen durch einen bzw. drei Waschschriffe: optimale Färbung bei Inkubation mit PE-konjugiertem anti-CD25 mit 32 als erstes Reagenz und drei folgenden Waschschriffen vor der zweiten Färbung. Inkubation in großem Volumen (siehe 2.5.2.1.); mAb CD4 CD25 als Referenzfärbung. (B) Vergleich von reiner Antikörperfärbung, mFab Doppelfärbung und gemischten mAb – mFab Färbungen (C) Abhängigkeit der Färbung vom Inkubationsvolumen:

Titration in kleinen (96-well Platte), wie auch in großen (15 ml-Röhrchen) Volumina. *overlay*-Histogramme nach *pregating* auf mFab anti-CD4 APC .

### 3.2.5. Robuste Streptamer-Färbungen mit murinem anti-CD4 und anti-CD25 unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Nachdem im Zuge der Optimierung der mFab Doppelfärbungen wesentliche, zu berücksichtigende Parameter im Färbeprozedere aufgedeckt und definiert wurden, sollte noch einmal die generelle Robustheit der reversiblen Fab-Streptamer-Färbung untersucht werden, ehe die Reagenzien zur Zellsortierung verwendet würden. So wurde neben bereits genannten, für die Doppelfärbung entscheidenden Parametern wie Waschschriffen, Färbereihenfolge und – volumina auch der Schritt der Inkubation und das genaue Vorgehen hierbei untersucht. Dabei sollte sichergestellt werden, dass häufige oder im laboralltäglichen Umgang mit Antikörpern übliche Handgriffe wie das Vortexen oder Zentrifugieren einer Probe auch bei Verwendung muriner reversibler Reagenzien keine Probleme bereiten würden. Hierfür wurden multimerisierte Reagenzien für einfach (mFab anti-CD4 PE) oder

doppelt (mFab anti-CD25 mut 32 PE und mAb aCD4 APC; Daten nicht gezeigt) zu färbende Zellen – nach 40 min Multimerisation und vor Zugabe zu den Zellen und folgender 20 min Inkubation – in PCR-Tubes entweder mittels Vortexer gemischt oder abzentrifugiert, oder es wurde beides nacheinander durchgeführt. Die so inkubierten Proben wurden nach Waschschritten und Lebend-Tod Färbung (siehe 2.5.2.1.) mittels FACS analysiert. Das hier gezeigte Beispiel einer mFab-Färbung verdeutlichte in der vergleichenden Histogramm-Darstellung für mFab anti-CD4 PE, dass keinerlei Unterschied in der Färbeintensität zwischen unbehandelten (*standard*) und mittels Vortexer gemischten/ zentrifugierten (*vortex*, *zentrif*, *vortex + zentrif*) Proben bestand und eine Färbung mit Hilfe reversibler Reagenzien auch unter diesen Bedingungen robuste und konstante Ergebnisse liefern würde (Abb. 12 A).

Neben einer zusätzlichen Behandlung der Färbeproben wurde die Inkubationszeit der murinen *Streptamer*-Reagenzien variiert. Auch um Vorgänge und Kinetik der reversiblen Färbungen besser zu verstehen, wurde hierzu eine nach Standard-Protokoll durchgeführte einfache *Streptamer*-Färbung (mAb aCD4 APC, mFab anti-CD25 mut 32 PE) mit einem Ansatz verglichen, bei dem man auf eine 40 min Multimerisierungsphase verzichtete und stattdessen die beiden Färbereagenzien und *Strep*-Tactin einzeln und unmittelbar zu den Zellen gab und diese für 20 min inkubierte. Sollte unter solchen Umständen genügend Zeit für die Bildung der *Streptamer*komplexe zu Verfügung stehen oder konnten diese sich überhaupt im Beisein der Zellen bilden? Und blieb die Reversibilität der Komplexe hierbei erhalten?

Um nicht nur den Färbeerfolg, sondern auch die Funktionalität der Reagenzien in Färbungen mit zeitgleicher Multimerisierung zu untersuchen, wurde der genannte Vergleich mit einem Ablöseexperiment kombiniert. Verglichen wurde eine gemäß Protokoll durchgeführte *Streptamer*-Färbung (mAb aCD4 APC, mFab anti-CD25 mut 32 PE), eine reine Antikörperfärbung als Referenz (mAb aCD4 APC, aCD25 PE) und die *Streptamer*-Färbung ohne Vorinkubation der Reagenzien. Nur letztere wurde einem kompletten Ablöse-Test unterzogen (siehe 2.5.2.2.). Die FACS-Analyse zeigte eine mit der Antikörperfärbung vergleichbare Standard-*Streptamer*-Färbung (Abb. 12 B, obere Reihe) mit gut abgrenzbarer PE/CD25-positiver Population. Auch die Probe ohne Multimerisationszeit lieferte eine in der Intensität zwar etwas schwächere, sonst jedoch immer deutlich abgrenzbare Färbung. Der Ablösetest mit Nachfärbung durch *Strep*-Tactin und Färbereagenz fiel ebenfalls erfolgreich aus und zeigte keinerlei Unterschiede oder Uneindeutigkeiten gegenüber vorangegangenen Ablöseexperimenten (Abb. 12 B, untere Reihe). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Anfärbung von CD4 CD25 doppelt-positiven Zellen unter Verwendung reversibler Reagenzien auch ohne eine vorausgehende Multimerisation der einzelnen Komponenten einer Fab-Färbung möglich war. Die Komplexbildung verlief offenbar unmittelbar bei Zusammenführung von Fab und *Strep*-Tactin und war in gemeinsamer Inkubation und Anwesenheit der Zellen möglich, ohne dass dies zu nennenswerten Verlusten bei der Färbequalität oder Einbußen in der Reversibilität führen würde. Erkenntnisse aus diesen Versuchen zur Robustheit von *Streptamer*-Färbungen halfen, ein besseres Gespür im Umgang mit diesen neuen Reagenzien zu bekommen und dienten im Weiteren immer wieder dazu, die Fehlersuche bei

fehlgeschlagenen oder nicht optimalen Färberegebnissen von vornherein einzugrenzen. Eine ursprünglich angenommene 40 min Multimerisationszeit wurde im Verlauf in den meisten Experimenten dennoch eingehalten, da sie sich in der Regel gut in die Versuchsplanung einfügte.

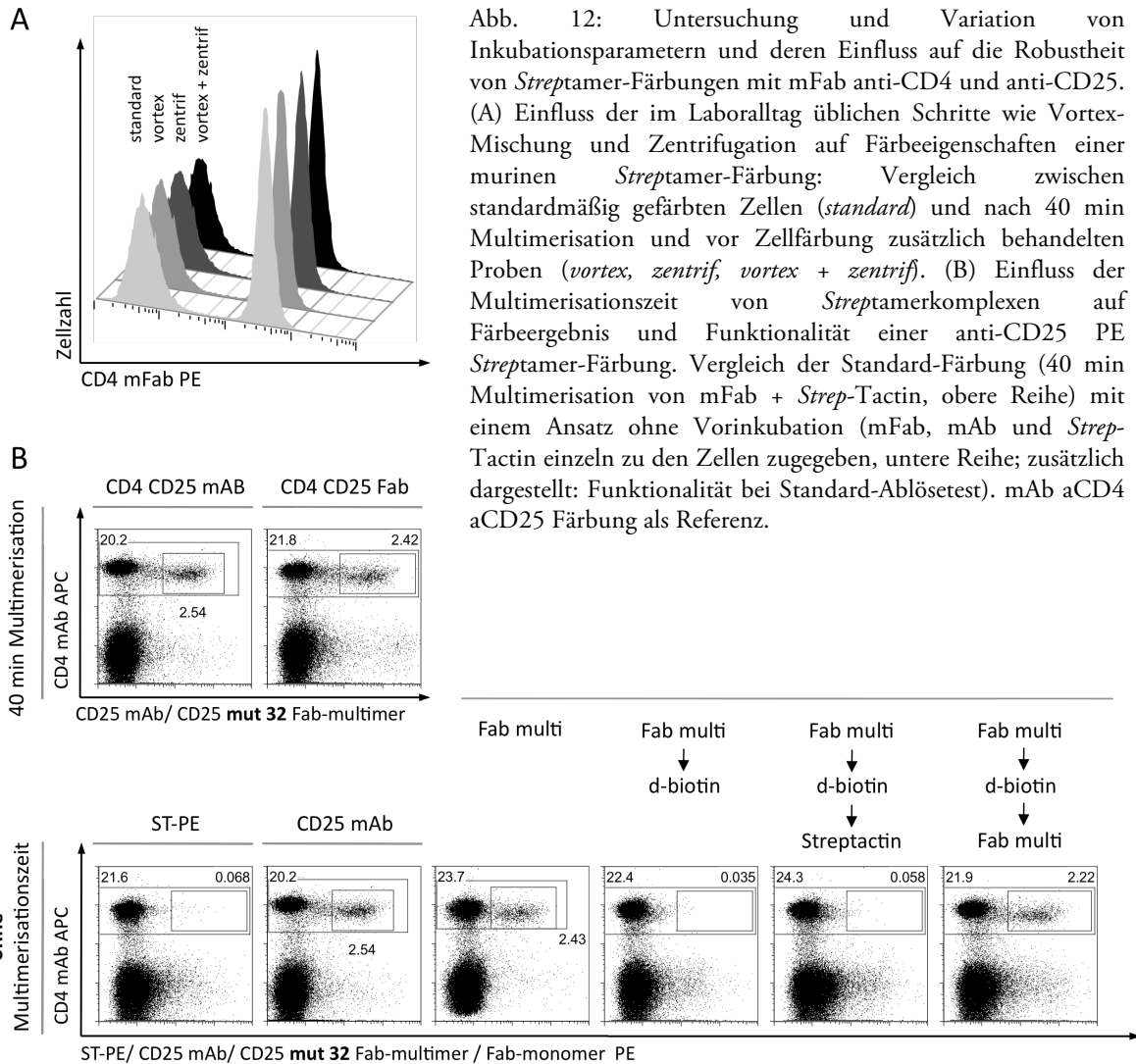


Abb. 12: Untersuchung und Variation von Inkubationsparametern und deren Einfluss auf die Robustheit von *Streptamer*-Färbungen mit mFab anti-CD4 und anti-CD25. (A) Einfluss der im Laboralltag üblichen Schritte wie Vortex-Mischung und Zentrifugation auf Färbereigenschaften einer murinen *Streptamer*-Färbung: Vergleich zwischen standardmäßig gefärbten Zellen (*standard*) und nach 40 min Multimerisation und vor Zellfärbung zusätzlich behandelten Proben (*vortex*, *zentrif*, *vortex + zentrif*). (B) Einfluss der Multimerisationszeit von *Streptamer*komplexen auf Färberegebnis und Funktionalität einer anti-CD25 PE *Streptamer*-Färbung. Vergleich der Standard-Färbung (40 min Multimerisation von mFab + *Strep*-Tactin, obere Reihe) mit einem Ansatz ohne Vorinkubation (mFab, mAb und *Strep*-Tactin einzeln zu den Zellen zugegeben, untere Reihe; zusätzlich dargestellt: Funktionalität bei Standard-Ablösetest). mAb aCD4 aCD25 Färbung als Referenz.

### 3.2.6. FACS-Zellsortierung nach *Streptamer*-Färbung mit murinem anti-CD4 und anti-CD25

Vor dem Hintergrund aller bisher vorgestellten Ergebnisse zur Untersuchung von Färbereigenschaften, Ablöseverhalten und Qualität der reversiblen *Streptamer*-Färbung mit murinem anti-CD4 und anti-CD25, konnten die neuen Reagenzien im nächsten Schritt erstmals bei der Gewinnung regulatorischer T-Zellen mittels FACS-Zellsortierung angewandt werden. Die reversible Methode zur durchflusszytometrischen Isolierung der nTregs sollte hierbei mit konventionellen Sortierungen Antikörper-gefärbter Zellen zumindest vergleichbar sein, wenn nicht gar diese in Reinheit übertreffen. Sortierungen wurden anfangs nur mit einfachen *Streptamer*-Färbungen (i.d.R. mFab anti-CD25 PE und mAb aCD4 APC) versucht und unter Einführung und Veränderung der erläuterten Färbeparameter

(siehe 2.5.2.1. und 3.2.4.) schrittweise optimiert. Erst im Verlauf und nach Titration von Färbereihenfolge, Waschschritten und Volumina war auch die Zellsortierung doppelt gefärbter (mFab anti-CD25 PE, anti-CD4 APC) Proben erfolgreich. Schließlich konnten Fab-*Streptamer*-Sortierungen – Einzel- wie Doppelfärbung – routinemäßig und in reproduzierbaren Versuchen durchgeführt werden und standen den Zellsortierungen konventionell gefärbter Proben in nichts nach. Hier dargestellt finden sich exemplarisch ausgewählte Daten von durchflusszytometrischer Zellsortierung nach Einfach- wie Doppelfärbung (Näheres zu den Experimenten siehe 3.2.7). Ihre Färbemuster unterschieden sich weder untereinander, noch von Ergebnissen gewöhnlicher FACS-Analysen nicht-sortierter Zellen und auch nicht von denen konventionell bzw. mAb gefärbter Proben. Zu sehen sind typische CD4 CD25 Färbungen muriner Lymphozyten mit distinkten, gut abgrenzbaren Populationen doppelt-positiver Zellen in zu erwartender Frequenz. Eine jeweils aufgeführte Reinheitskontrolle, die unmittelbar nach Sortierung an demselben Gerät durchgeführt wurde, zeigt in beiden Fällen hohe Reinheiten von 98,8 % bzw. 99,7 % (Abb. 13 A). Solche und analoge Zellsortierungen wurden für zahlreiche, teils noch zu erwähnende Experimente (siehe 3.3) an unterschiedlichen Geräten, jedoch in standardisierter Vorgehensweise (siehe 2.5.6.) durchgeführt. Hier dargestellt ist eine Auswahl an Ergebnissen dieser Sortierungs-Experimente, welche die Reproduzierbarkeit und Robustheit einer Isolierung CD4 CD25 doppelt-positiver Zellen mittels reversibler mFab Färbung verdeutlichen sollen. Auch wenn die Einzeldaten in ihren Frequenzen variierten (verschiedene Experimente, unterschiedliche Versuchstiere) und ein Unterschied hinsichtlich des Färbemusters zwischen den beiden Geräten (*Aria* und *MoFlo II*) auffiel (gerätetechnische Differenzen wie Laser- und Detektoreinstellungen sowie Software) zeigen dennoch alle Graphen das typische Färbemuster einer murinen CD4 CD25 Färbung mit guter Intensität und klar abgrenzbarer doppelt-positiver Zellpopulation. Eine Kontrolle verdeutlicht die Vergleichbarkeit mit mAb gefärbten, sortierten nTregs – die Färbungen unterschieden sich nur in der bereits beschriebenen, etwas schwächeren Intensität der mFab Doppelfärbung. Ebenfalls dargestellt und hervorzuheben sind die zugehörigen Reinheitskontrollen, welche durchwegs hohe Reinheiten von über 93 % bis 100 % erbrachten, wobei die Ergebnisse der *MoFlo II*-Sortierungen gegenüber denen mit *FACSAria* schlechter ausfielen. Letztere zeigten im direkten Vergleich mit mAb-Färbungen stets höhere Reinheiten (Abb. 13 B).



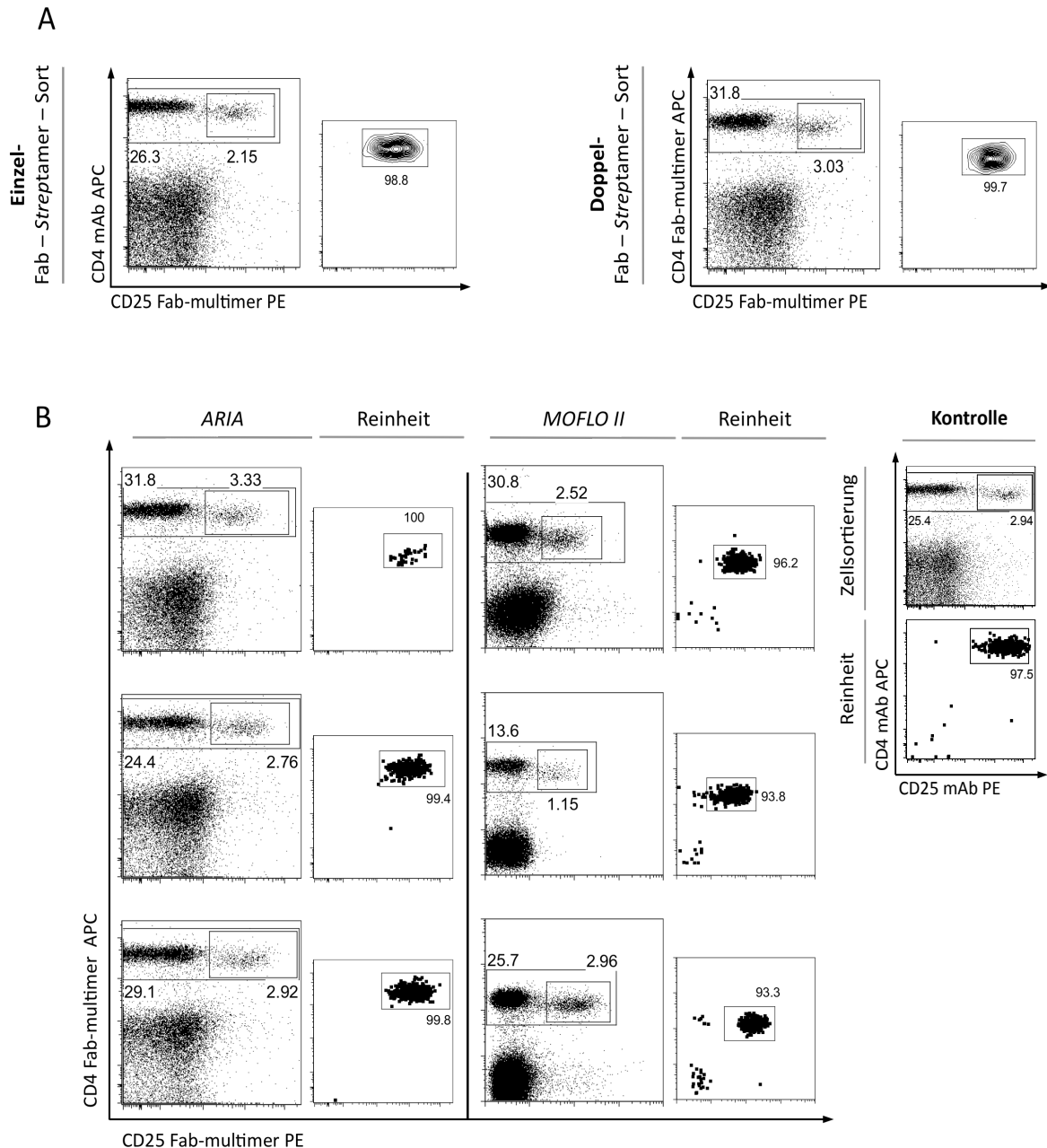


Abb. 13: FACS-Zellsortierung nach Fab-*Streptamer*-Färbung mit murinem anti-CD4 und anti-CD25 (A) Exemplarisch ausgewählte Darstellung von Einfach- (links) und Doppel-Fab-*Streptamer* Zellsortierung mittels FACSARIA. Unterschiede in der Frequenz wurden nicht beachtet, da es sich um zwei verschiedene Experimente (unterschiedliche Versuchstiere) handelt. Daneben aufgeführt: Reinheitskontrollen (am selben Gerät durchgeführt). (B) Ausgewählte FACS-Ergebnisse verschiedener Experimente zur Verdeutlichung der Reproduzierbarkeit in (A) vorgestellter Daten – auch an unterschiedlichen Geräten. Daneben aufgeführt: Reinheitskontrollen (am selben Gerät durchgeführt). Die dargestellte Kontrolle (rechts) zeigt beispielhaft das Färbemuster einer Sortierung aCD4 aCD25 (mAb) gefärbter Zellen. Varianzen in der Frequenz wurden nicht beachtet, da es sich um eine Zusammenschau von Daten verschiedener Experimente (unterschiedliche Versuchstiere) handelt.

### 3.2.7. Sortierung Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen – Nachweis für die Färbespezifität der neuen *Streptamer*-Färbung mit murinem anti-CD4 und anti-CD25

Alle bisher vorgestellten Ergebnisse der Arbeit mit murinen Fab-*Streptameren* anti-CD4 und anti-CD25 deuteten darauf hin, dass T-Zellen damit in absolut vergleichbarer Qualität zu Antikörpergefärbten Kontrollen detektiert, Zellsortierungen in hoher Qualität durchgeführt und die neuen Färbereagenzien auch mit großer Zuverlässigkeit wieder abgelöst werden konnten. Noch zu klären war allerdings, ob diese doppelt-positiv angefärbten und isolierten Zellen tatsächlich regulatorische T-Zellen darstellten, deren schonende Gewinnung Ziel dieser Arbeit war. Zwar deuteten die oben erläuterten Daten bereits darauf hin, doch fehlte bisher ein direkter Nachweis.

Um diese Frage nach Färbespezifität der neuen reversiblen Reagenzien zu beantworten, diente das im folgenden letzten Abschnitt des zweiten Ergebnisteils vorgestellte Experiment. Da CD4 und CD25 alleine keine exklusive Detektion regulatorischer T-Zellen erlauben und stattdessen mit dieser Markerkombination insbesondere in nicht-naiven Mäusen auch zahlreiche aktivierte Effektorzellen angefärbt würden (siehe 1.2.2.1.), war der spezifischere Nachweis von Foxp3 mittels intranukleärer Färbung notwendig.

Um diese Frage nach Spezifität mit der Funktionalität der reversiblen mFabs und der Möglichkeit zur Zellsortierung von nTregs zu verknüpfen, also in einem Versuch zu zeigen, dass die Sequenz von Zellfärbung mittels mFabs, Zellsortierung der markierten Zellen, Ablösung der Reagenzien und damit Gewinnung von quasi unberührten regulatorischen T-Zellen in hoher Reinheit möglich war, wurde nachfolgender Versuch durchgeführt:

Murine Lymphozyten wurden – anfangs mit Einzel-*Streptamer*-Färbung (mFab anti-CD25 PE, mAb aCD4 APC) später auch mit Doppelfärbung (mFab anti-CD25 PE anti-CD4 APC) – angefärbt und mittels Zellsortierung (*FACS Aria*) isoliert. Nach Feststellung der Reinheit wurde die Ausbeute von i.d.R. zwischen 150.000 und 250.000 doppelt-positiven T-Zellen (pro Milz einer naiven C57BL/6 Maus) einem Standard-Ablösetest (siehe 2.5.2.2.) unterzogen um einerseits zu verdeutlichen, dass das Prinzip der Reversibilität auch in durchflusszytometrischen Anwendungen unverändert funktionierte und andererseits zu überprüfen, wie sich die Reinheit der gewonnenen Zellen in einer Nachfärbung darstellte. Nachdem diese Vorgaben in der Einzel-*Streptamer*-Färbung vollständig erfüllt und eine Reinheit von 98,8 % nach Zellsortierung bzw. 99,8 % nach erfolgreicher Ablösung (0,29 % PE-positive Zellen nach D-Biotin Gabe; 0,72 % bei Nachfärbung mit *Strep-Tactin PE*) und Nachfärbung als sehr gutes Ergebnis bezeichnet werden konnte (Abb. 14, obere Reihen; Durchflusszytometrie-Abbildung bereits in Abb. 13 A gezeigt) wurde das Experiment mit einer Doppel-*Streptamer*-Färbung wiederholt. Nach Anfärbung einer distinkten doppelt-positiven Population in typischer Frequenz (3,03 %), Zellsortierung in hoher Reinheit (99,7 %) und erfolgreicher Ablösung mit D-Biotin (0,046 % doppelt-positiv Zellen), wurde die Ausbeute der Zellsortierung in zwei Fraktionen halbiert. Anschließend wurde mit einer Hälfte der Zellen ein Ablösetest durchgeführt, welcher erneut die Funktionalität der reversiblen

mFabs (0,077 % doppelt-positive Zellen bei Nachfärbung mit *Strep*-Tactin PE und APC; 98,5 % Reinheit bei Nachfärbung mit mFab) unterstrich. Die zweite Hälfte der Zellen wurde nach Fixierung und erneuter Oberflächenfärbung (mAb CD4 APC, CD25 PE) in eine intranukleäre Färbung auf Foxp3 PB überführt (siehe 2.5.4.). Der grau unterlegte Graph zeigt das abschließende Ergebnis dieses Versuchs, welches mit einem Anteil von 97,7 % Foxp3<sup>+</sup> Zellen nach mFab-Sortierung den Nachweis zur Färbespezifität der murinen Fab-*Streptamere* anti-CD4 und anti-CD25 erbringen konnte.

Eine Kontrolle nicht-sortierter, mAb gefärbter Zellen desselben murinen Materials (links) zeigte nach intranukleärer Färbung keinen höheren Anteil (95,7 %) an nTregs (Abb. 14, mittlere und untere Reihe).

Dieser Versuch konnte die Tests zu Färbeeigenschaften, Ablösbarkeit und Reversibilität und Anwendung in der durchflusszytometrischen Zellsortierung um den entscheidenden Faktor der Spezifität komplettieren. Damit durften die ersten murinen Fab-*Streptamere*, anti-CD4 und anti-CD25, als einsatzbereit betrachtet werden und eine Anwendung in funktionellen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen schonend isolierter regulatorischer T-Zellen war möglich.

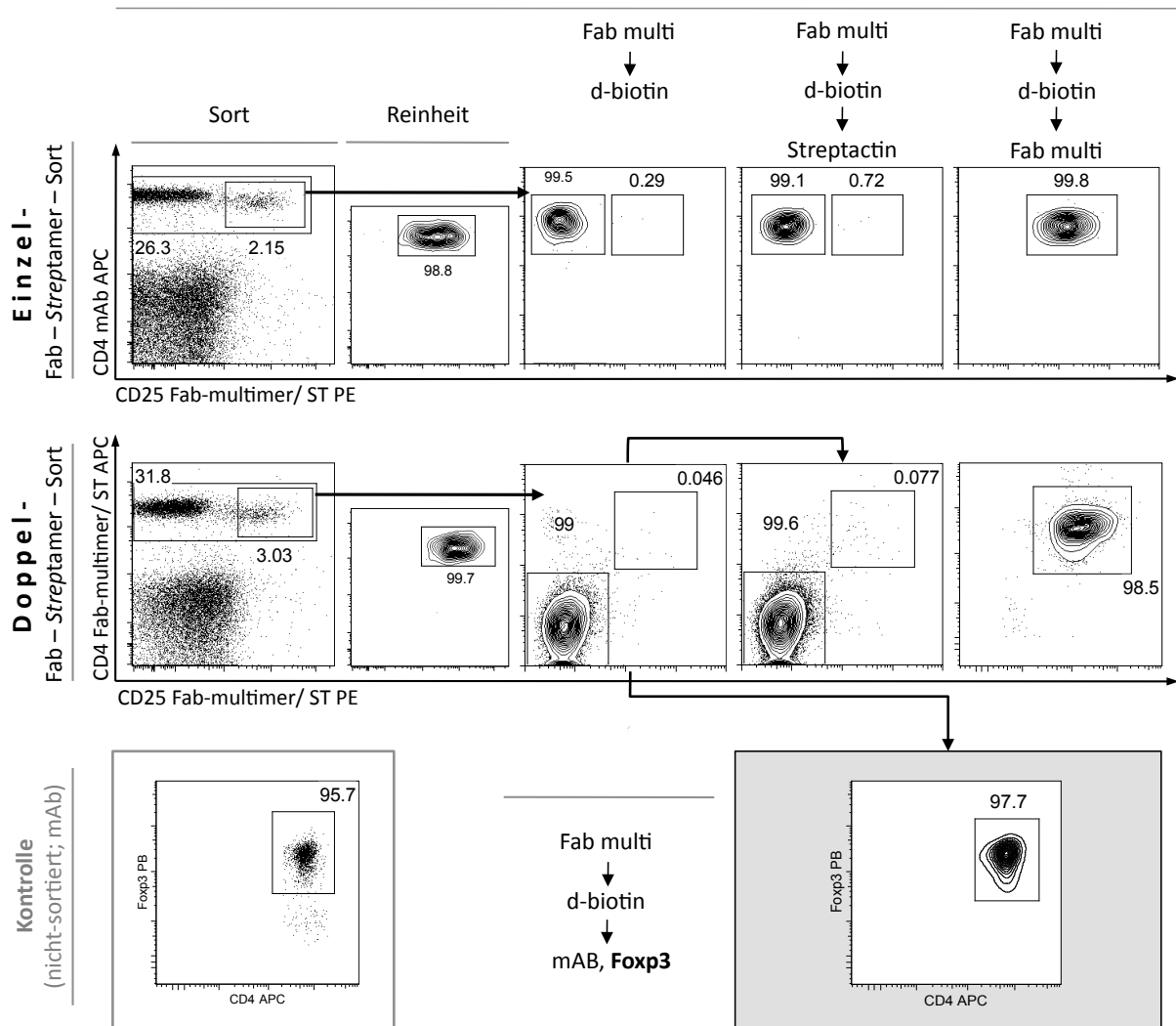


Abb. 14: Nachweis der Färbespezifität der murinen Fab-Streptamere anti-CD4 und anti-CD25. Versuchssequenz: mFab-Färbung – Zellsortierung – Ablöse-Experiment – intranukleäre Foxp3 Färbung. Murine Lymphozyten wurden nach Einfach- oder Doppel-Fab-Streptamer-Färbung (mFab anti-CD25 PE, mAb aCD4 APC bzw. mFab anti-CD25 PE anti-CD4 APC) sortiert (FACSARIA). Jeweils zugehörige Reinheitskontrollen (am selben Gerät durchgeführt) sind mit dargestellt. Ausbeute nach Zellsortierung wurde einem standardisierten Ablösetest unterzogen. Ablösung nach Einzelfärbung (obere Reihe). Nach Zellsortierung und Ablösung der Doppelfärbung (mittlere Reihe) mittels D-Biotin wurde die Ausbeute halbiert. Ersten Hälfte: Standard-Ablösetest. Zweite Hälfte: Fixierung, erneute Oberflächenfärbung (mAb CD4 APC, CD25 PE) und intranukleäre Färbung auf Foxp3 PB (untere Reihe, rechts). Die Kontrolle (untere Reihe, links) stellt intranukleäre Färbung nicht-sortierter, mAb gefärbter Zellen desselben murinen Materials dar.

### 3.3. FUNKTIONALITÄT mFAB-STREPTAMER GEFÄRBTER TREGS *IN VITRO* UND *IN VIVO*

Die murine reversible Streptamer-Färbung (anti-CD4, anti-CD25) wurde u.a. entwickelt, um in Vergleichsanalysen zwischen hiermit gewonnenen und sogenannten konventionell gefärbten murinen Tregs Unterschiede in der Zellfunktion aufzudecken. Hinweise auf verbesserte Vitalität und Funktion reversibel gefärbter Zellen – ohne eventuell störende Sortierungsmarker auf der Zelloberfläche – und der daraus folgende Nutzen dieser Populationen sollten dabei untersucht werden. Für derartige funktionelle Betrachtungen der vermuteten positiven Auswirkung muriner Streptamer-Färbung auf Tregs wurde versucht, die Proliferations- und Suppressionsfähigkeit, sowie das Überleben konventionell/ mAb- und mFab-gefärbter Tregs in verschiedenen Mausmodellen zu vergleichen.

#### 3.3.1. Vergleich suppressiver Eigenschaften von mAb- und mFab-gefärbten nTregs mittels Suppression Assay

Das suppressive Potential gegenüber Effektorzellen ist eine zentrale Fähigkeit regulatorischer T-Zellen und kann mittels *Suppression Assay* (siehe 2.4.7.) untersucht werden. Diese *in vitro* Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, um die Suppressionsfähigkeit reversibel gefärbter und sortierter Tregs gegenüber Antikörper-behandelten Zellen zu analysieren.

Hierzu wurden CD4<sup>+</sup> C57BL/6 Tresp Zellen (*T-responder*-Zellen, CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) mit mAb/Fabstreptamer isolierten C57BL/6 Tregs (CD45.1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) für drei Tage in Kultur genommen und die Hemmung der Tresp Proliferation mittels eFluor<sup>®</sup>-Färbung gemessen. Nach mehreren Vorversuchen mit verschiedenen Titrationsverhältnissen zwischen Tregs und Tresp, wurde als Kompromiss aus benötigter Zellzahl nach Sortierung und Detailtiefe der Datenauswertung die Titrationsreihe auf die Stufen 1:2, 1:8, 1:16, 1:32, (1:64) (Treg : Tresp) beschränkt. Die polyklonale Stimulation erfolgte durch anti-CD3ε Stimulation (1µg/ml) in Gegenwart kongener APCs (CD45.1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>). Als Referenz für maximale Proliferation der Tresp dienten Ansätze ohne Tregs, als Kontrolle für ruhende Tresp solche ohne Tregs und ohne aCD3. In Abhängigkeit der verfügbaren Zellzahl wurden Zweifach- bzw. Dreifachansätze jeder Titrationsstufe inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei Tagen mittels Antikörperfärbung (aCD45.1, aCD4, aCD25) und FACS-Analyse. Die drei Zellpopulationen (APCs, Tresp, Tregs) wurden mittels spezifischer Markerkombination unterschieden und der suppressive Effekt anhand der Fluoreszenzverdünnung von CFSE- bzw. eFluor<sup>®</sup> innerhalb der Tresp-Population überprüft. Die exemplarisch ausgewählte Auswertung eines solchen Experiments (Abb. 15 A) zeigte eine Titrationsreihe (1:2, 1:8, 1:16, 1:32) mAb- bzw. mFab gefärbter Tregs. In der Gegenüberstellung von mAb- und mFab-Ansätzen fiel ein reproduzierbarer – wenn auch geringer – Unterschied in der Suppression der CD45.1<sup>+</sup> Tresp-Population auf. Trotz der vergleichbaren Tendenz

eines mit sinkender Treg-Zahl abnehmenden suppressiven Effekts auf die Tresp-Population (mAb: 6,88 – 34% Proliferation; mFab: 5,65 – 22,9% Proliferation) wurde in allen Titrationsstufen eine stärkere Suppression durch mFab-behandelte Tregs erreicht – ein Effekt der insbesondere bei sehr niedrigen Treg Zahlen noch bestehen blieb. Durch eine überlappende Histogramm-Darstellung (Titrationsstufe 1:32 im Vergleich mit Kontrollen, Abb. 15 B) verdeutlicht und als Säulendiagramm auf die Maximalproliferation (Kontrolle) normalisiert (Abb. 15 C) zeigte sich ein leichter Vorteil in der suppressiven Funktion reversibel gefärbter Tregs. Jedoch erbrachte die Gesamtauswertung über alle durchgeführten *Suppression Assays* (Abb. 15 D, analog zu C, nur Gesamtauswertung gezeigt) wie bereits berichtet eine große Schwankungsbreite.<sup>49</sup> Es zeigte sich kein signifikanter Vorteil in der Funktionalität der mittels mFab-*Streptamer* sortierten Tregs – jedoch auch kein Nachteil.

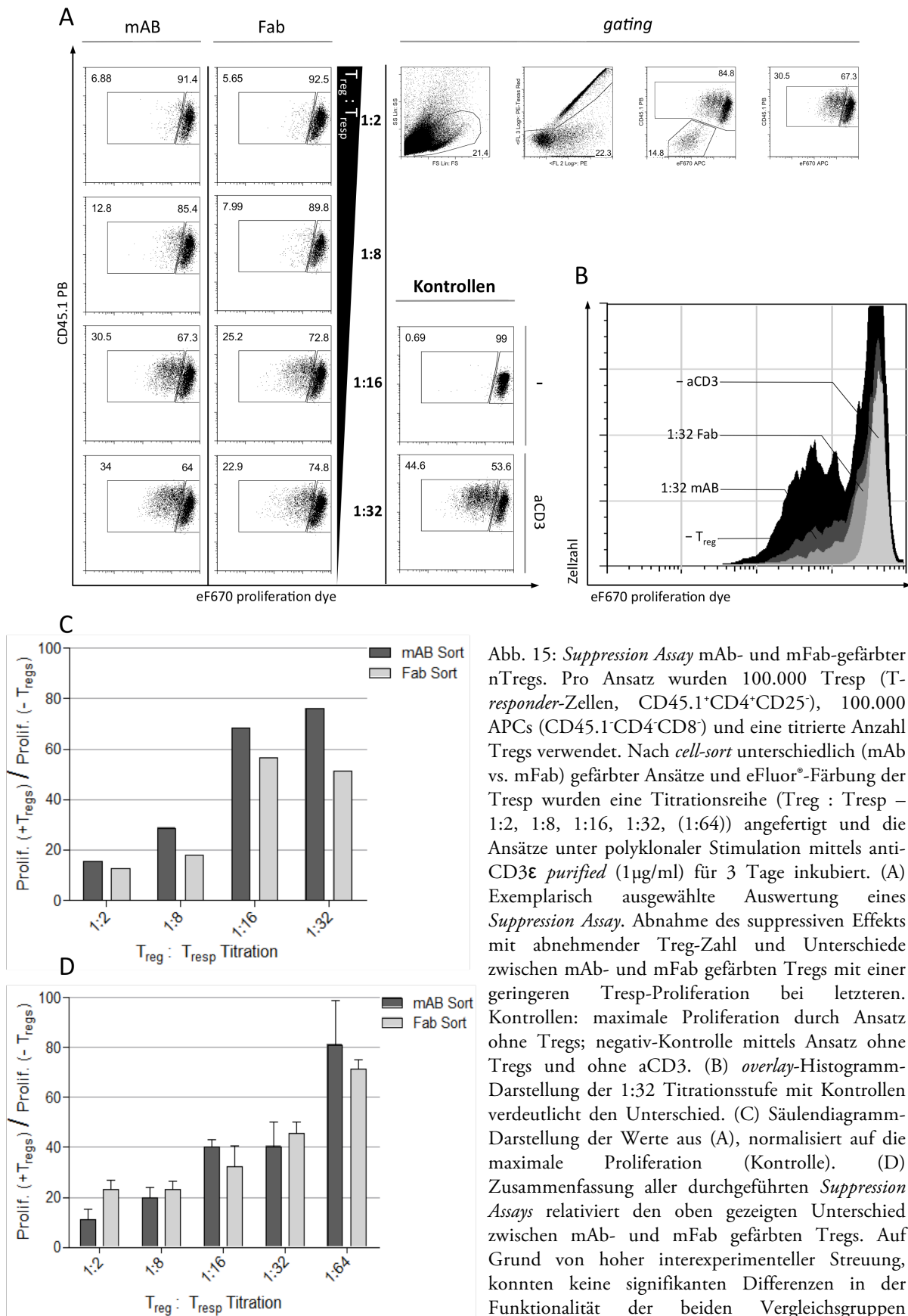


Abb. 15: *Suppression Assay* mAb- und mFab-gefärbter nTregs. Pro Ansatz wurden 100.000 Tresp (T-responder-Zellen, CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), 100.000 APCs (CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) und eine titrierte Anzahl Tregs verwendet. Nach *cell-sort* unterschiedlich (mAb vs. mFab) gefärbter Ansätze und eFluor<sup>®</sup>-Färbung der Tresp wurden eine Titrationsreihe (Treg : Tresp – 1:2, 1:8, 1:16, 1:32, (1:64)) angefertigt und die Ansätze unter polyklonaler Stimulation mittels anti-CD3 $\epsilon$  *purified* (1 $\mu$ g/ml) für 3 Tage inkubiert. (A) Exemplarisch ausgewählte Auswertung eines *Suppression Assay*. Abnahme des suppressiven Effekts mit abnehmender Treg-Zahl und Unterschiede zwischen mAb- und mFab gefärbten Tregs mit einer geringeren Tresp-Proliferation bei letzteren. Kontrollen: maximale Proliferation durch Ansatz ohne Tregs; negativ-Kontrolle mittels Ansatz ohne Tregs und ohne aCD3. (B) *overlay*-Histogramm-Darstellung der 1:32 Titrationsstufe mit Kontrollen verdeutlicht den Unterschied. (C) Säulendiagramm-Darstellung der Werte aus (A), normalisiert auf die maximale Proliferation (Kontrolle). (D) Zusammenfassung aller durchgeführten *Suppression Assays* relativiert den oben gezeigten Unterschied zwischen mAb- und mFab gefärbten Tregs. Auf Grund von hoher interexperimenteller Streuung, konnten keine signifikanten Differenzen in der Funktionalität der beiden Vergleichsgruppen ausgemacht werden.

### 3.3.2. Vergleich der Zellproliferation von mAb- und mFab-gefärbten nTregs

Da der *Suppression Assay* als nicht ausreichend erschien den Einfluss oberflächengebundener Färbereagenzien auf die Funktionalität der Tregs und den damit verbundenen Unterschied zwischen mAb- und mFab-Färbung herauszustellen, wurde ein weiteres *in vitro*-System verwendet. Zumal die Betrachtung von *in vitro* Suppression nicht allein von markerfreien IL-2 Rezeptoren auf Tregs abhängig ist, sollte sich der neue Ansatz nunmehr vorwiegend auf die proliferationsfördernde Inhibition einer CD25 Blockade der sortierten Zellen konzentrieren. Hierfür wurde der *Suppression Assay* vereinfacht um durch einen kürzeren experimentellen Ablauf und weniger Parameter auch eine geringere Varianz der Ergebnisse zu erreichen. In diesem Proliferation Assay sollte allein das Zellwachstum mAb- bzw. mFab-gefärbter und sortierter Tregs unter Einfluss von IL-2 verglichen werden. Im Vorfeld wurde hierfür die optimale IL-2 Konzentration (5U/ml) titriert, bei welcher eine gerade noch messbare Proliferation festzustellen war. Analog zum Prozedere des zuvor beschriebenen *Suppression Assays* wurden nun Tregs mit mAb bzw. mFab gefärbt (erstere abgelöst), sortiert, mit eFluor® 670 behandelt und unter polyklonaler Stimulation mittels APCs und anti-CD3 (1µg/ml) für 3 Tage inkubiert. Dargestellt ist die FACS-Analyse zweier gegenübergestellter Dreifachansätze mit mAb- bzw. mFab-behandelten Tregs. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne IL-2 (Abb. 16 A). Das Ergebnis zeigte auch hier eine gewisse Streuung der Werte für die Proliferation der Tregs (mAb: 13,6%; 8,1%; 13,1%; mFab: 27,2%; 15%; 15,8%), doch lag der Anteil an proliferierten mFab Tregs stets über dem der mAb-gefärbten. Diese Tendenz blieb auch nach Auswertung und Zusammenfassung aller durchgeführten Proliferation Assays bestehen und wird als tendenzieller Unterschied in der Proliferation der beiden unterschiedlich gefärbten Treg-Ansätze deutlich (signifikant nach nicht-parametrischem Wilcoxon Rank-Sum/ Mann-Whitney-U Test,  $W=9$ ,  $p=0,1$ , Abb. 16 B).



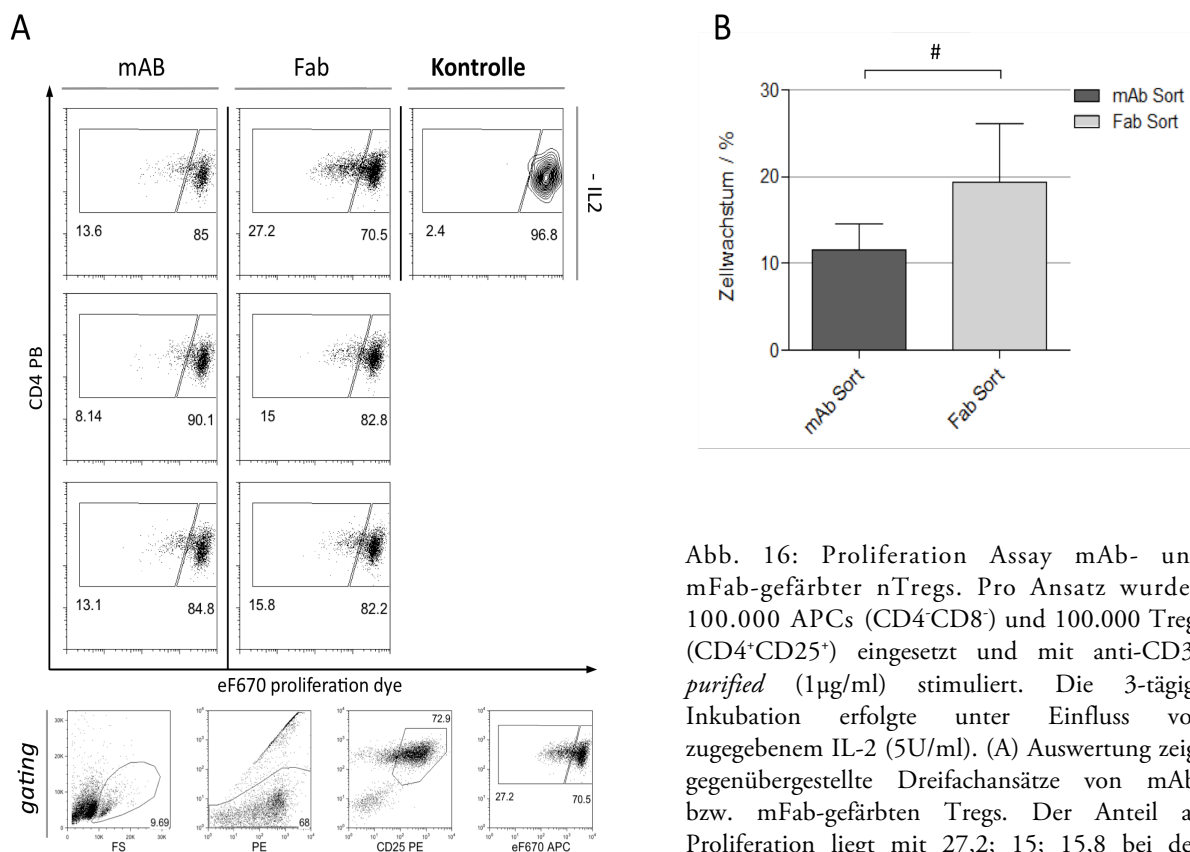


Abb. 16: Proliferation Assay mAb- und mFab-gefärbter nTregs. Pro Ansatz wurden 100.000 APCs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) und 100.000 Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) eingesetzt und mit anti-CD3 $\epsilon$  *purified* (1 $\mu$ g/ml) stimuliert. Die 3-tägige Inkubation erfolgte unter Einfluss von zugegebenem IL-2 (5U/ml). (A) Auswertung zeigt gegenübergestellte Dreifachansätze von mAb- bzw. mFab-gefärbten Tregs. Der Anteil an Proliferation liegt mit 27,2; 15; 15,8 bei den mFab-behandelten Zellen stets höher als bei den konventionell gefärbten (13,6;8,1;13,1). Kontrolle: Ansatz ohne IL-2. (B) Zusammenfassende Darstellung aller durchgeführten Proliferation Assays zeigt eine etwas höhere Proliferation für mFab-gefärbte und -sortierte Tregs (Wilcoxon Rank-Sum Test, W=9, p=0,1).

### 3.3.3. *In vivo* Funktionalität: adoptiver Transfer von Tregs

Neben *in vitro* Experimenten zu Suppression und Proliferation, sollte auch das Verhalten reversibel gefärbter Tregs nach adoptivem Zelltransfer *in vivo* betrachtet werden. Hierzu wurden Zellen – sortiert oder als Milzzellfraktion – mit oder ohne Antikörperbehandlung in mehrere Mausmodelle mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund transferiert um Überleben und Proliferationsfähigkeit zu überprüfen.

In ersten Versuchen wurde zunächst auf Zellsortierung mittels FACS verzichtet und ausschließlich der Einfluss von Färbeantikörpern auf das Überleben von Tregs *in vivo* betrachtet. Hierfür wurden komplette Milzzellfraktionen CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 präpariert und entweder mit  $\alpha$ CD4 APC und  $\alpha$ CD25 PE mAb behandelt oder ohne Färbung belassen (siehe 2.6.2). Die Frequenz der Tregs wurde mittels FACS-Analyse eines Aliquots überprüft um im folgenden Transfer in beiden Gruppen die gleiche Anzahl an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen (je 600.000 Tregs innerhalb der Milzzellfraktion) zu injizieren. Ein ausgewähltes Beispiel dieser Versuchsreihen (Abb. 17 A) zeigt das Ergebnis eines vergleichenden Transfers mAb-behandelter und unbehandelter Milzzellen acht Tage nach Injektion in C57BL/6 Mäuse. Die darin aufgeführte Treg-Frequenz vor Transfer (2,61%) findet sich auch nach Beendigung des

Experiments (2,62 bzw. 2,69%). Die Analyse von Milz und Lymphknoten zeigte die transferierten CD45.1<sup>+</sup> Populationen in beiden Gruppen in vergleichbarer Fraktion (CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>: 0,22% unbehandelt vs. 0,2% mAb-behandelt). Jedoch unterschieden sich auch die innerhalb der transferierten Milzzellen proliferierten Treg-Populationen kaum zwischen beiden Gruppen. In der mAb-Gruppe zeigte sich mit 96,1% ein höherer Anteil an Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen als in der unbehandelten Fraktion (87%). Weitere Experimente ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation mit und ohne Antikörperfärbung.

Um auch potentiell geringe Unterschiede zu erfassen, sollten weitere Transferexperimente mit hochrein sortierten Tregs durchgeführt werden. Vorversuche in denen mAb-gefärbte Milzzellfraktionen und mittels mAbs sortierte Tregs in vergleichbarer Zahl transferiert wurden, zeigten keine Unterschiede bezüglich der Proliferation, sodass wesentliche Einflüsse durch die FACS-Sortierung selbst vernachlässigt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Erste vergleichende Zelltransfers nach durchflusszytometrischer Zellsortierung (Vergleich: Fab, abgelöst vs. mAb, siehe 2.6.2) erfolgten in naive C57BL/6 Mäuse, zeigten jedoch keine Unterschiede bezüglich der Proliferation (Daten nicht gezeigt). Um transferierten Tregs ein größeres freies Kompartiment zu ermöglichen und so die vermuteten Unterschiede in der Expansion zu verstärken, wurden sortierte Tregs in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert. Ein ausgewähltes Experiment (Abb. 17 B) zeigt stellvertretend vergleichbare Ergebnisse in der FACS-Sortierung nach Färbung mittels CD4 CD25 mAb bzw. murinem Fab und hohe Reinheiten in beiden Fällen (mAb: 99,2%, Fab: 99,6%). Es wurden jeweils 200.000 Zellen transferiert. Acht Tage nach Transfer zeigte sich jedoch in beiden Gruppen nahezu keine Proliferation bzw. kaum Überleben (0,036 bzw. 0,037% aller analysierten Zellen) der übertragenen Tregs.

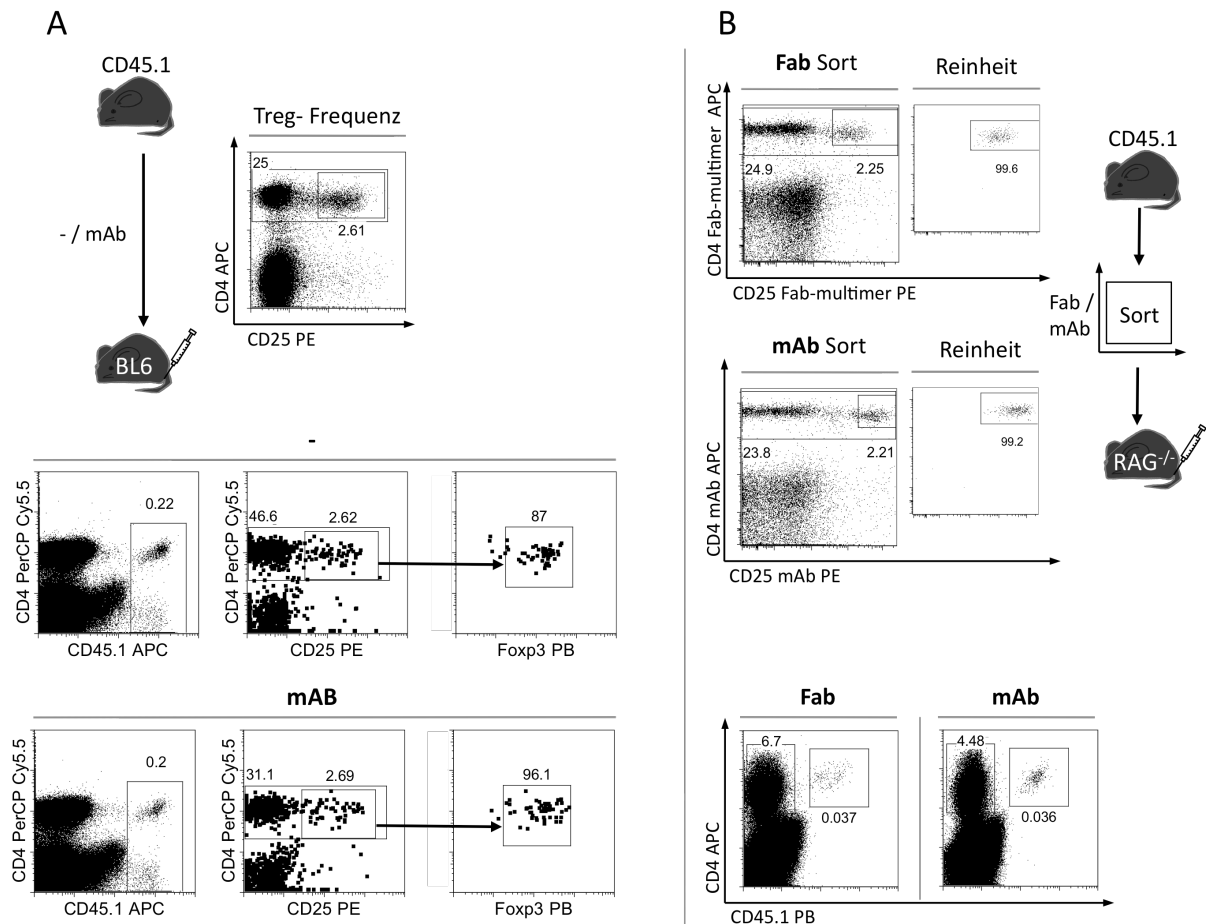


Abb. 17: Adoptiver Zelltransfer reversibel gefärbter Tregs (CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>). (A) Vergleichender Transfer kompletter Milzzellfraktionen mit und ohne CD4 CD25 mAb Behandlung vor Injektion in C57BL/6. Dargestellt ist die mittels FACS-Analyse eines Aliquots bestimmte Treg-Frequenz innerhalb der Milzzellsuspension zur Festlegung der Anzahl zu transferierender Tregs. Ergebnis: 8 Tage nach Transfer von je 600.000 Zellen in C57BL/6 zeigte sich wenig Zellexpansion und keinerlei Unterschied bzgl. der Proliferation zwischen Antikörper-gefärbten und unbehandelten Zellen. (B) Ein Transfer sortierter (mAb vs. Fab; Reinheit dargestellt) Tregs in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte 8 Tage nach Gabe kaum Proliferation und keine verwertbaren Unterschiede in der Proliferation reversibel gefärbter bzw. mAb behandelter Tregs. Exemplarisch ausgewähltes Beispiel der Versuchsreihe.

### 3.3.4. *In vivo* Funktionalität: reversibel gefärbte Tregs im DEREK-Mausmodell

Da alle bisher gezeigten Daten darauf hinwiesen, dass weder die physiologische Situation in C57BL/6 noch ein leeres Lymphozytenkompartiment in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen eine für vergleichende Analysen ausreichend starke Expansion der transferierten Tregs erlaubte, wurde mit der DEREK Maus ein Modell gewählt, mit dessen Hilfe hochspezifisch und bei ansonsten intaktem immunologischen Milieu alleine die Population der regulatorischen T-Zellen depletiert und damit selektiv ein freies Kompartiment für transferierte Tregs geschaffen werden konnte.

In ersten Versuchen sollten wieder zwei Vergleichsgruppen mit CD4 CD25 mAb bzw. Fab gefärbten Zellen naiver CD45.1<sup>+</sup> Mäuse mittels FACS sortiert, mit Biotin abgelöst und anschließend in vergleichbarer Anzahl transferiert werden. Hierfür wurden DEREK Mäuse typisiert und anschließend an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Diphtherietoxin (DT) behandelt. Nach Depletion erfolgte an Tag

4 der Transfer frisch sortierter Tregs (siehe 2.6.1). Auch nach Zellgabe schloss sich bis zum Ende des Experiment jeden zweiten Tag eine DT-Gabe an. Nach acht Tagen wurde der Versuch beendet und die Expansion der transferierten Tregs mittels FACS analysiert. Hier zeigte sich ebenso in beiden Gruppen eine vergleichbare, jedoch wider Erwarten nur geringe Proliferation der Zellen. Die Ergebnisse ähnelten auch nach wiederholter Durchführung denen nach Transfer in C57BL/6. Es zeigte sich kein Unterschied in der Proliferation reversibel und Antikörper-gefärbter Zellen. Genauere Auswertungen ergaben, dass in den verwendeten DEREK Mäusen, trotz fehlenden eGFP Signals in der FACS-Analyse keine vollständige Depletion der endogenen Tregs stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden, über die Standard-Typisierung (siehe 2.6.1.) hinaus, nähere Untersuchungen der Depletionskinetik und der Treg-Frequenzen vor und nach DT-Gabe durchgeführt (Abb. 18 A). So zeigen FACS-Daten einer Blutentnahme vor DT-Gabe (mAb-Färbung: CD4 APC, CD25 PE; intranukleäre Färbung: Foxp3 PB) das charakteristische Färbemuster regulatorischer T-Zellen, analog zu bisher gezeigten CD4 CD25 Färbungen, mit einer typischen Frequenz der hier eGFP<sup>+</sup> transgenen Tregs (CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup>: 1,4%). Nahezu alle CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> wiesen ein deutliches Signal für CD25 (87,6%) und diese wiederum für Foxp3 (97,7%) auf und konnten damit eindeutig als regulatorische T-Zellen identifiziert werden. Bei Betrachtung der CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> Zellen (12,5%) fiel auch hier eine kleine Population an CD25<sup>+</sup> (0,76%) auf, wovon wiederum ein gutes Drittel zusätzlich positiv für Foxp3 war (36,8%). Diese für eine DT-Depletion offenbar unerreichbaren Tregs stellten insgesamt betrachtet 0,8% aller CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> Zellen der untersuchten DEREK Maus (Abb. 18 A, obere Abbildungsgruppe). Um der Frage nachzugehen, ob diese Population das Treg-Kompartiment auch nach DT-Depletion für transferierte Tregs versperrte, wurden die Zellverhältnisse während und nach DT-Gabe weiterverfolgt. Eine Depletionskinetik (Abb. 18 A, mittlere Abbildungsgruppe) zeigt, dass bereits zwei Stunden nach einer ersten DT-Gabe die Frequenz der transgenen CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> Tregs von 1,4% auf 1,28% gesunken war. 22 Stunden später konnte nur noch eine Restpopulation (0,09%) nachgewiesen werden, die nach einer zweiten DT-Gabe und weiteren 24 Stunden komplett verschwunden war. Die DT-Gabe wurde, analog zu den oben erläuterten Experimenten, jeden zweiten Tag fortgeführt, das Experiment an Tag 8 nach zweiter DT-Injektion beendet. Anschließend wurde das vor Depletion verwendete Färbeschema wiederholt um die Ergebnisse genauer zu untersuchen. Die FACS-Analyse zeigte zum einen weiterhin eine zuverlässige Depletion der eGFP<sup>+</sup> Tregs, wenn auch eine Restpopulation (0,1%) teilweise CD25- und Foxp3-positiver Zellen detektiert werden konnte. Als auffällig erwies sich jedoch die Untersuchung der CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> Zellen. Hier zeigten sich nun 12,8% der CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> Zellen für CD25 positiv und hiervon 71,2% für Foxp3. Der Anteil an Foxp3<sup>+</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> war also von 0,8% vor DT-Gabe auf 12,9% nach Depletion angestiegen und entsprach demnach wieder Treg-Frequenzen naiver Mäuse.

Um das DEREK-Modell trotz scheinbar unvollständiger Depletion verwenden zu können, sollten in einem abgewandelten Transfer-Experiment Treg-Transfer und DT-Gabe unmittelbar aufeinanderfolgen

um eine Etablierung der transferierten Zellen in dem kurzen Zeitfenster zwischen ausreichend fortgeschrittener Depletion der transgenen und beginnender Proliferation der DT-insensitiven, endogenen Tregs zu ermöglichen. Hierzu wurden in einem ersten Schritt mAb- bzw. Fab-gefärbte Tregs sortiert. Die vergleichbaren durchflusszytometrischen Ergebnisse in hoher Reinheit (Fab: 99,6%, mAb: 99,2%) sind in Abb.18 B dargestellt. Je DEREK-Maus wurden 350.000 Zellen transferiert. Zwei Stunden später erfolgte die erste DT-Gabe – die zweite 24 Stunden später. Daran schlossen sich analog zu vorangegangenen Experimenten jeden zweiten Tag weitere DT-Gaben. Der Versuch wurde an Tag 8 beendet und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die exemplarische Darstellung der Daten einer Maus je Gruppe (mAb- vs. reversibel gefärbte Zellen) zeigt einerseits das Verhältnis von endogenen zu transferierten Foxp3<sup>+</sup> Zellen (Abb. 18 B, unten; linke Spalte), wobei auffällt, dass im Vergleich zu Transfers *nach* DT-Depletion dieses Verhältnis zugunsten der transferierten Zellen verschoben ist. Dennoch macht andererseits die Tatsache, dass trotz Transfer *vor* DT-Gabe die Zahl der endogenen eGFP<sup>+</sup> Tregs überwiegt (1,4 (2,23)% endogene vs. 0,66 (0,31)% transferierte Tregs) deutlich, dass mit diesem DEREK Modell keine ausreichende Zellproliferation der transferierten Tregs erreicht werden konnte. Ein Vergleich beider Gruppen erbrachte erneut keinen signifikanten Unterschied zwischen mAb- und Fab-gefärbten Tregs bezüglich ihrer Proliferation (Abb. 18 B, unten; mittlere und rechte Spalte).

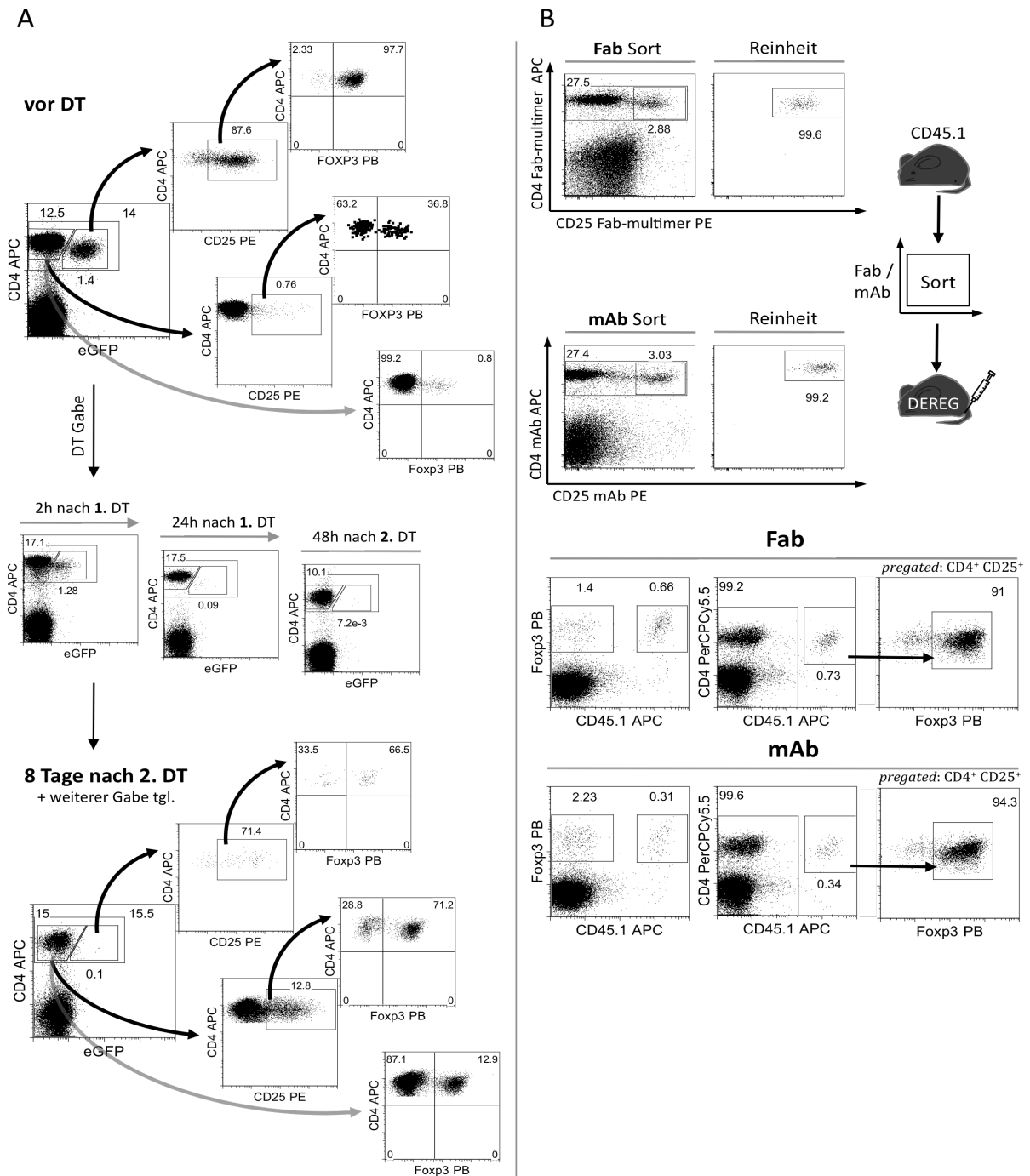


Abb. 18: Reversibel gefärbte Tregs im Dereg-Mausmodell. (A) Untersuchung endogener Treg Populationen in Dereg und Depletionskinetik nach Diphtherietoxin (DT)-Gabe: Nach geringer Proliferation transferierter Tregs in Vorversuchen, Analyse des freien Kompartiments bei Depletion. *Vor* DT-Gabe – FACS-Analyse nach CD4 APC, CD25 PE, Foxp3 PB Färbung (eGFP: FITC-Signal) zeigte neben eGFP<sup>+</sup> endogenen Tregs eine kleine Population eGFP<sup>-</sup> (also DT-insensitiver) Tregs (0,8% aller eGFP<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen). Depletionskinetik – eGFP<sup>+</sup> Tregs bereits 24 h nach 1. DT-Gabe kaum noch nachweisbar. Komplette Depletion 24 h nach 2. DT-Gabe. Weitere DT-Gabe jeden 2. Tag bis Tag 8. *Nach* DT-Gabe – Tag 8 nach 2. DT-Gabe FACS-Analyse analog zu oben: eGFP<sup>+</sup> Tregs weiterhin depletiert. eGFP<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen von 0,8% auf 12,9% expandiert. Faktisch nur unvollständige Depletion mittels DT möglich. (B) Transferexperiment mit CD4 CD25 mAb- bzw. Fab-Sortierung und Zellgabe unmittelbar vor 1. DT-Gabe um ein freies Kompartiment *vor* Expansion der DT-insensitiven endogenen Tregs mit transferierten Zellen zu besetzen. Verhältnis von endogenen zu transferierten Foxp3<sup>+</sup> Zellen gegenüber Transfers *nach* Depletion zugunsten der transferierten Zellen verschoben – dennoch starke Expansion endogener Tregs. Eine ausreichende Proliferation der transferierten mAb- bzw. Fab-gefärbten Zellen wurde nicht erreicht. Unterschiede in der Proliferation beider Gruppen konnten nicht gezeigt werden.

## 4. DISKUSSION

Methoden der Gen- und Zelltherapie sind heute unabdingbarer Hauptbestandteil in einer neuen Generation von Behandlungsmöglichkeiten für Krankheiten und Störungen des menschlichen Abwehrsystems. Innerhalb der ganzen Bandbreiten solcher Erkrankungen bestünde in vielen Fällen die Notwendigkeit unser Immunsystem zellvermittelt zu supprimieren und so überschießende oder fehlgeleitete Immunantworten einzudämmen. Möglich ist dies durch regulatorische T-Zellen, kurz Tregs, eine kleine Zellpopulation, welche erstmals 1995 von Sakaguchi *et al.* als eigenständig charakterisiert werden konnte. Diese ca. 5 – 10% starke Subpopulation innerhalb der CD4+ Zellen definiert sich durch die Expression von Foxp3 als dem bisher einzigen für sie spezifischen Merkmal. Weiterhin charakteristisch sind die Unfähigkeit IL-2 oder Th1/Th2-typische Zytokine zu produzieren, eine permanent erhöhte CD25 Expression, niedrige IL-7 Rezeptor Spiegel und schließlich ihre Abhängigkeit von IL-2 aus der Umgebung um zu überleben und sich teilen zu können. (siehe 1.2.2.1.) Ihr großes immunsuppressives Potenzial wurde in einer langen Reihe von Suppressionsmechanismen *in vitro* wie *in vivo* beschrieben und ist Gegenstand aktueller Forschung. Trotz diesbezüglich zahlreicher Unklarheiten in der Datenlage zwischen *in vitro* und *in vivo* scheinen insbesondere die immunmodulatorische Interaktion mit APCs und ihrer Fähigkeit autoreaktive Tef Zellen zu stimulieren von Bedeutung. (siehe 1.2.2.3.) Im Gegensatz zu dem großen Wissen über Treg-Funktionen erweist sich die lange erhoffte therapeutische Anwendung dieser Zellen als problematisch. Denn ihre geringe Frequenz sowie die Schwierigkeit einer exakten Charakterisierung und hochreinen Isolierung mangels spezifischer Oberflächenmarker stellen deutliche Hindernisse dar. Nichtsdestotrotz dauern gegenwärtig unternommene Anstrengungen diesbezüglich weiter an, da die Schlüsselrolle von Tregs bei der Unterdrückung pathologischer Autoimmunität spätestens seit der Beschreibung von IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy, X linked syndrome*) und dem hierzu äquivalenten Modell der *Scurfy*-Maus unbestritten ist. (siehe 1.2.2.4.) So treten regulatorische T-Zellen, deren zentrale Bedeutung für immer mehr immunologische Dysfunktionen aufgedeckt wird, in den letzten Jahren besonders in den Fokus und befinden sich im Moment an der Schwelle zur klinischen Anwendung.

Eine vielversprechende Möglichkeit diese Zellen für die sichere Behandlung von Patienten zugänglich zu machen, bietet die reversible Färbung, welche eine hochreine positive und serielle Anreicherung ohne die auf der Zelle verbleibenden Sortierungsmarker und die damit verbundenen Nachteile verspricht. Diese Technologie basiert auf der Idee der MHC-Multimere (siehe 1.5.1.), ist jedoch nicht auf die Detektion und die Isolierung von antigenspezifischen T-Zellen begrenzt. Vielmehr besitzt sie durch Verwendung niedrig-affiner Fab-Moleküle anstelle von MHCs die Spezifität des jeweiligen parentalen Antikörpers. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip einer reversiblen Färbung auf die Treg-typischen Oberflächenantigene CD4 und CD25 angewendet, um erstmals murine reversible Reagenzien gegen

diese Marker zu generieren und Tregs so schonender zu isolieren und sozusagen unberührt für zukünftige therapeutische Ansätze nutzbar zu machen. Die Begründung für eine solche schonende Isolierung beruht unter anderem auf der Vermutung, oberflächengebundene Färbereagenzien könnten – nach durchflusszytometrischer Isolierung auf der Zelloberfläche verbleibend – mit der Funktionalität der markierten Antigene interferieren. (siehe 1.4) Nach erfolgreicher Herstellung und Untersuchung der Reversibilität sollten daher beide Fab-*Streptamere* mit konventioneller anti CD4- und anti CD25-Antikörperfärbung verglichen und ihr Einfluss auf die Funktion und die Vitalität isolierter Tregs *in vitro*, wie auch *in vivo* nach adoptivem Transfer in verschiedenen Mausmodelle untersucht werden.

Das Projekt sollte somit als experimenteller Ansatz der Grundlagenforschung verstanden werden, der parallel zu *in vitro* Tests mit humanen reversiblen CD4- und CD25-Fab *Streptameren* durchgeführt wurde. In der Maus wurden damit erste *in vivo* Ergebnisse zu dieser neuen Färbe- und Anreicherungsmethode gewonnen, die den Weg zu einer künftigen Anwendbarkeit in murinen Krankheitsmodellen aufzeigen.

## HERSTELLUNG MURINER ANTI-CD4 UND ANTI-CD25 FAB-STREPTAMERE

Ausgangsmaterial für die Generierung der Fab-*Streptamere* bzw. ihrer Einzelkomponenten ( $V_H$ ,  $C_H$ ,  $V_L$ ,  $\kappa/\lambda$  und  $C_L$ ) bildete die cDNA der Hybridome PC61 (*IgG1 $\lambda$*  Antikörper gegen murines CD25) und GK1.5 (*IgG2b $\kappa$*  Antikörper gegen murines CD4). Hieraus sollten die unbekannt Sequenzen der variablen Regionen isoliert werden. Versuche mittels halbspezifischer RACE-PCR und poly-A bzw. poly-G *Tailing* V- und C-Regionen in einem Schritt zu amplifizieren ergaben jedoch auch nach PCR-Optimierung und Variation verschiedener publizierter Primer (Gilliland et al. 1996; Zhan et al. 2000; Rintisch et al. 2008) nur unspezifische oder unvollständige Sequenzierergebnisse (Abb. 1). Ursache hierfür könnte ein verfrühter Abbruch der Reversen-Transkriptase Reaktion gewesen sein, da kein PCR-Produkt die erwartete Länge von über 1000bp, bestehend aus C-, V- und *Hinge*-Region sowie poly-A bzw. -G Terminus aufwies. Darüber hinaus gestaltete sich auch die Wahl der richtigen Primer aufgrund des komplexen Rearrangements der Immunglobuline, sowie der in den Hybridomen enthaltenen Pseudogene (Gilliland et al. 1996; Zhan et al. 2000; Rintisch et al. 2008) schwierig. Von einer weiteren Etablierung dieses Ansatzes wurde jedoch abgesehen, da zeitgleich neue Erkenntnisse mit einer ersten Generation humaner Fab-*Streptamere* gewonnen wurden, für deren Herstellung Primer zur spezifischen Amplifikation allein der variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L$  verwendet worden waren.

Obschon diese Primer (siehe 2.1.8.) ursprünglich für die Isolierung muriner DNA-Sequenzen aus anti-humanen Mausantikörpern entwickelt wurden, ließen Vergleichsanalysen muriner V-Regionen und denen der Ratte, eine Eignung für die spezifische Amplifikation aus PC61 (anti-CD25) und GK1.5 (anti-CD4) vermuten. Die in Abb. 2 gezeigten Ergebnisse bestätigten diesen Gedanken und lieferten die gesuchten Fab-Bestandteile  $V_H$  PC61,  $V_H$  GK1.5 und  $V_L$  GK1.5. Eine Ausnahme bildete  $V_L\lambda$  PC61, welches mit



den genannten Primern nicht erfasst werden konnte. Amplifikationsversuche mit dem eigentlich für GK1.5 entworfenen Primer  $V_{LK}$  brachten ebenfalls nicht das gewünschte Produkt, womit eine potentielle  $\kappa$ -Variante von  $V_{LPC61}$  ausgeschlossen wurde.

Da die Vergleichsanalyse der V-Regionen von Maus und Ratte bereits ausreichende Übereinstimmung gezeigt hatte, sollte eine Untersuchung der Heterogenität innerhalb der  $\lambda$ - bzw.  $\kappa$ -Klassements eine Erklärung für die fehlende Primerspezifität bei  $\lambda$  finden. Die Analyse (Abb. 3) konnte in Übereinstimmung mit publizierten Daten über die Struktur von Immunglobulinen (Eisen and Reilly 1985; Sanchez et al. 1987) zeigen, dass  $V\lambda$ -Sequenzen – im Vergleich zu relativ homogenen  $\kappa$ -Sequenzen – aufgrund ihrer Heterogenität in drei Untergruppen differenziert werden müssen, was bei der Herstellung humaner Fab-*Streptamere* nicht auffiel, da in der Maus  $\kappa$ -Varianten der leichten Kette vorherrschen und so die  $\lambda$ -Primer keine Verwendung fanden. Mit Hilfe von neuen auf diesen Erkenntnissen basierenden Primern für alle drei Subgruppen von  $V_L\lambda$  konnte  $V_{L\lambda PC61}$  schließlich erfolgreich amplifiziert werden.

In einzelnen Klonierungsschritten wurden  $V_{HPC61}$ ,  $V_{HGK1.5}$ ,  $V_{L\lambda PC61}$  und  $V_{L\kappa GK1.5}$  zunächst mit zugehörigen C-Regionen zusammengeführt, die schweren Ketten zusätzlich mit *Strep*-tag® Sequenzen fusioniert und die vollständigen leichten und schwere Ketten schließlich als ein bicistronisches Operon in einem finalen Expressionsvektor verbunden. Probleme bereitete jedoch die erste Klonierung der variablen Sequenzen in die Donorvektoren des StarGate®-Systems. Im Gegensatz zu der sequenzanalytisch bestätigten erfolgreichen Klonierung der leichten Ketten  $V_{LK GK1.5}$  und  $V_{L\lambda PC61}$  konnten  $V_{HPC61}$  und  $V_{HGK1.5}$  zwar durch mehrmalige Optimierung von PCR und Klonierungsverfahren nach Ligation und Transformation erstmals im Donorvektor nachgewiesen werden, doch ergaben Sequenzanalysen von  $V_{HPC61}$  wiederholt trunkeerte *forward* oder *reverse* Primer (z.B. fehlende TCCC-*combinatorial site*) bzw. Primerverdopplungen, während bei  $V_{HGK1.5}$  einzelne Basendeletionen am 3' -Ende des *forward* Primers auftraten. (Abb. 4) Auch der Einsatz eines Donorvektors (pEntry IBA 51) mit zusätzlichen Terminator-Regionen zur Effizienzsteigerung durch Ausschluss eventueller geringer Hintergrundexpression der für *E.coli* potentiell toxischen schweren Ketten blieb ohne Erfolg. Mittels Mutagenese-PCR wurde daher versucht zumindest die Sequenzen mit wenigen Fehlern klonieren zu können. Hierzu wurde  $V_{HGK1.5}$  aufgrund der geringsten Sequenzfehler mittels *blunt end*-Klonierung in einen Standard-Vektor überführt, wo die Deletion durch eigens entworfene Primer erfolgreich korrigiert wurde. Nach Rückführung in den Donorvektor und Sequenzanalyse waren die variablen Bestandteile des murinen anti-CD4 Fabs komplett (Abb. 5). Aufgrund zu großer Sequenzfehler wurde im Fall von  $V_{L\lambda PC61}$  die vollständige Synthese der variablen Region bevorzugt, nachdem ihre Sequenz seit erfolgreicher Amplifikation bekannt war. Damit war es möglich die weiteren Klonierungsschritte mit beiden Fabs fortzuführen.

Eine überzeugende Erklärung für die Diskrepanz in der Klonierungseffizienz zwischen den leichten und schweren Ketten wurde nicht gefunden. Auffällig waren wiederkehrende Deletionen, trunkeerte Enden und Duplikationen, die insbesondere in den Primersequenzen der schweren Ketten auftraten. PCR-

Optimierung, Erneuerung des cDNA-Ausgangsmaterials, Ersatz durch neue Primer und Austausch der verwendeten Enzyme konnten keine Abhilfe schaffen.

Die weiteren Klonierungsschritte mittels StarGate® beinhalteten die Fusion von V- und C-Regionen in zwei Schritten als ( $V_L + C_L$ ) und ( $V_H + C_H + \text{One-STrEP Strep-tag}^\circ$ ) und die anschließende Überführung in einen Expressionsvektor. Nach der erfolgreichen Klonierung der Konstrukte (Abb. 6) wurden die beiden ersten murinen Fab-One-STrEP *Strep-tag*® Fusionsproteine, mFab anti-CD4 und anti-CD25 in *E.coli* periplasmatisch exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen mittels *Strep tag*®-*Strep*-Tactin Affinitätschromatographie. Abschließend wurden die Konstrukte mittels SDS-PAGE und Silberfärbung auf etwaige Verunreinigungen und Vollständigkeit überprüft. Sowohl für anti-CD4 als auch für anti-CD25 konnte die Vollständigkeit von schwerer und leichter Kette ohne Degradationsprodukte oder Verunreinigung in nennenswerter Menge nachgewiesen werden (Abb. 7). Aufgrund zuverlässiger Resultate mit dieser Verfahrensweise während der Generierung erster humaner Fab-*Streptamere* (Stemberger et al. 2012), wurden die Ergebnisse aus Western Blot und Silberfärbung als ausreichend aussagekräftige Qualitätskontrolle gewertet. Da trotz hoher Sensitivität klassische Analyseverfahren wie der Silberfärbung durch frei wählbare Parameter untersucherabhängig bleiben, sollte zukünftig eine höhere Standardisierung angestrebt werden. Durch automatisierte Analyseschritte (z.B. *Bioanalyzer*) (Kuschel et al. 2002; Antes et al. 2010) könnten die Ergebnisse von Proteinexpression- und aufreinigung exakter quantifiziert werden um so genauere Aussagen zu eventuellen Problemen mit Färbespezifität und Ablöseeigenschaft künftiger mFabs machen zu können. Im Folgenden wurden die murinen Fab-*Streptamere* erstmals getestet um ihrer Anwendung bei der Gewinnung und Nutzung muriner nTregs einen Schritt näher zu kommen.

## TEST MURINER FAB-STREPTAMERE IN FACS-FÄRBUNG UND ZELLSORTIERUNG

Die durchgeführten Tests umfassten neben der Überprüfung von Färbereigenschaften und Spezifität der neuen Fab-*Streptamere*, den essentiellen Nachweis zu Ablösbarkeit und Reversibilität der Färbungen. Des Weiteren sollte eine Methode zur Fab-*Streptamer* gestützten Isolierung von nTregs mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung etabliert werden.

In einem ersten direkten Vergleich der neuen Fab-*Streptamere* anti-CD4 und anti-CD25 mit parentalen mAbs derselben Fluoreszenzkonjugation (Abb. 8) konnten robuste und in Färbeintensität und Abgrenzbarkeit der Populationen überzeugende Ergebnisse erzielt werden. Distinkte Positiv-Populationen CD4<sup>+</sup> bzw. CD25<sup>+</sup> T-Zellen ermöglichten ein problemloses *gating*, so dass eine, verglichen mit konventionellen mAbs, geringfügig niedrigere Färbeintensität nicht ins Gewicht fiel. Die anti-CD25 Fab-Färbung zeigte sogar eine deutlicher abgegrenzte Population mit einem geringer ausgeprägten Kontinuum an intermediär gefärbten Zellen. In beiden Fällen liegen die kleinen Unterschiede unter Umständen jedoch im Schwankungsbereich der Expressionsqualität einzelner Fab-

Fragment Chargen. Bisherige Daten wurden mit Produkten nur zweier Expressionen generiert. Daher könnte durch eine weiter zu verbessernde Standardisierung der Expressionsbedingungen geklärt werden, inwieweit es sich hierbei um stabile Färbeunterschiede handelt. Unabhängig von solchen sicherlich diskutablen Details konnte mit diesem Ergebnis eine mit den parentalen Antikörpern vergleichbare Funktionalität der ersten murinen Fab-*Streptamere* gezeigt werden.

Kerneigenschaft und Hauptvorteil der Fab-*Streptamere* ist ihre Ablösbarkeit. Gemäß dem Prinzip der reversiblen Multimerfärbungen besitzt ein monomeres Fab-Molekül alleine eine zu geringe Affinität zu seinem Antigen, wodurch eine stabile Bindung ausschließlich im multimerisierten Zustand möglich ist. Eine Auflösung der Multimerkomplexe durch Zugabe von kompetitivem D-Biotin soll somit zu einer spontanen Abdissoziation der Fab-Monomere von der Zelloberfläche führen und die Zelle damit „unberührt“ zurücklassen bzw. eine erneute Anfärbung ermöglichen. (siehe 1.5.2.) Mit einem standardisierten Ablöseexperiment wurde dieses Prinzip an den neu entwickelten murinen Fab-*Streptameren* untersucht. Für anti-CD4 konnte hierbei gezeigt werden, dass eine mit mAbs vergleichbare CD4 *Streptamer*-Färbung nach Zugabe von D-Biotin vollständig beseitigt werden kann und auch durch eine Nachfärbung mittels *Strep*-Tactin keine Fab-Monomer-Rückstände auf den Zellen detektierbar bleiben. Dass *Strep*-Tactin selbst, ohne Wiederaufbau eines Multimers mit auf den Zelloberflächen verbliebenen Fabs keine stabile Bindung und auch darüber hinaus keine unspezifische Interaktion mit Zellen eingehen kann, wurde bereits 1997 gezeigt (Voss and Skerra 1997). Hingegen ist eine erneute Fab-*Streptamer*-Färbung nach zuvor erfolgter Ablösung in gleicher Qualität möglich und schließt aus, dass störendes D-Biotin in relevanter Konzentration im System verbleibt. Die in Abb. 9 intensiver erscheinende Zweitfärbung mit anti-CD4 Fab-*Streptamer* lässt sich vermutlich mit einer längeren Inkubationszeit der Zellen bei der zweiten Multimerfärbung erklären. Der leichte Intensitätsverlust der anti-CD3 mAb Färbung ist möglicherweise auf die allgemeine Strapazierung der Zellen während Wasch- und Zentrifugationsschritten, Inkubationszeiten und der gesamten Dauer dieses, als Analyseverfahren konzipierten Ablöseexperiments zurückzuführen. Dieses Ergebnis lieferte jedoch nicht nur einen Nachweis für die Reversibilität des murinen anti-CD4 Fabs. Es verdeutlicht auch, dass die etablierte Technologie der reversiblen MHC-*Streptamere* (Knabel et al. 2002; Neudorfer et al. 2007) ohne Verlust von Färbequalität auf weitere Oberflächenmarker übertragbar ist.

Erfahrungen mit der zur selben Zeit entstehenden Palette an humanen Fab-*Streptameren* hatten jedoch gezeigt, dass nur ein knappes Drittel aller bis dahin generierten Fab-Fragmente ohne weitere Modifikation eine für reversible Färbungen ausreichend niedrige Monomer-Affinität besitzen. Bei allen weiteren Reagenzien musste die Bindungsstärke der Fabs durch strukturelle Änderungen mit Hilfe von Austauschen spezifischer Aminosäuren verringert werden (Stemberger et al. 2012). So erbrachte die Analyse des anti-CD25 wt Fabs im Ablöseexperiment zwar ein überzeugendes Färbemuster und die Sensibilität der Färbung für D-Biotin zeigte eine prinzipielle Funktionalität. Das unverändert deutliche Signal bei Nachfärbung mit *Strep*-Tactin (Abb.9) ließ aber darauf schließen, dass die Affinität der

monomeren Fabs nicht niedrig genug war um eine spontane Abdissoziation von der Zelloberfläche zu erlauben.

Für die notwendige Affinitätsminderung des Fab-Fragments gegenüber seinem Antigen wurden durch Substitutionsmutationen innerhalb der *framework regions* – am Rande der CDRs – von  $V_H$  und  $V_L$  gezielt Basen ausgetauscht um v.a. große geladene Aminosäuren durch Alanin zu ersetzen. Die für eine Modifizierung des mFab anti-CD25 bestimmten Positionen ergaben sich einerseits auf der Basis publizierter SPR (*surface plasmon resonance*)-Spektroskopie Daten rekombinanter anti-CD4 Antikörper (Bes 2003), andererseits aus Erfahrungen mit erfolgreich modifizierten humanen Fab-Fragmenten (Stemberger et al. 2012). Basenaustausche an zwei oder mehr Positionen im Fab wurden zunächst nicht verfolgt, da in solchen Fällen bereits bei humanen Fab-Reagenzien oftmals ein deutlicher Verlust der Färbereigenschaften durch die Veränderung der Tertiärstruktur beobachtet worden war. Die gewünschte Affinitätsreduktion konnte jedoch durch einen Austausch von Tyrosin zu Alanin an Position 32 von  $V_L$  erreicht werden. (Abb. 10) Trotz inzwischen zahlreicher Erfolge dieser Methode bei humanen und murinen Fabs, wurde das hier gezeigte Ergebnis erst nach mehreren erfolglosen Modifikationen an anderen Positionen erreicht. Dies zeigt, dass ungeachtet einer bereits großen Erfahrung noch keine ausreichenden Vorhersagen über das Verhalten solcher Basen- und Strukturmodifikationen gemacht werden können und mittelfristig Färbetests notwendig bleiben. Alternativ könnte versucht werden, durch Modifikationen innerhalb der CDRs oder der *Hinge*-Region reproduzierbar niedrige Affinitäten zu erhalten ohne einen Verlust der Färbespezifität zu bewirken. Die Tatsache, dass die Mutation von anti-CD25 mut 32 noch innerhalb der CDR1 liegt zeigt, dass dies durchaus möglich ist.

Zusammengefasst erbrachte die Affinitätsreduktion bei mFab anti-CD25 mut 32 den Kompromiss aus guten, mit einer Antikörperfärbung vergleichbaren Färbereigenschaften und der vollständigen Reversibilität, die im Ablöseexperiment gezeigt werden konnte. Somit war das Paar aus mFab anti-CD4 und mFab anti-CD25 komplettiert und die Möglichkeit einer reinen mFab Doppelfärbung gegeben.

Um der Idee einer schonenden Isolierung regulatorischer T Zellen durch reversible Färbung einen Schritt näher zu kommen, sollten anti-CD4 und anti-CD25 in einer gemeinsamen *Streptamer*-Färbung kombiniert werden. Offen war nur, wie sich mFabs in einer solchen Doppelfärbung verhalten würden. Vorversuche hatten bereits verringerte Färbintensität und -spezifität sowie negativen Einflüsse auf die Ablösbarkeit gezeigt und ließen eine Interaktion zwischen verschiedenen *Streptamer*-Komplexen innerhalb eines Inkubationsvolumens vermuten. Um überschüssiges Reagenz aus der Probe zu entfernen und den Austausch von Fab-Fragmenten unterschiedlicher Spezifitäten zwischen den Streptactin-Matrizes zu minimieren sollten die einzelnen Färbeschritte durch Waschschrte getrennt durchgeführt werden. Diese Überlegungen zeigten sich bestätigt, nachdem erste sequentielle Färbungen zu einer wesentlichen Verbesserung der Färberegebnisse führten und einen Vergleich der mFab Doppelfärbung mit Antikörperfärbungen ermöglichten. Die zahlenmäßige Erhöhung der Waschschrte von einem auf drei zwischen den Färbungen resultierte schließlich in einer mFab Doppelfärbung, die in Färbqualität und

Abgrenzbarkeit der Populationen mit der mAb-Referenzfärbung vergleichbar war. Lediglich im Hinblick auf die Färbintensität zeigten sich geringe Unterschiede (Abb. 11 A). Dieser in mFab-Einzelfärbungen nicht in solchem Ausmaß beobachtete Effekt war der Kombination mit mFab anti-CD25 mut 32 geschuldet, wie gemischte mAb-mFab-Färbungen zeigten. Unter Umständen wird hier auch die negative Auswirkung von Mutationen innerhalb der CDR1-Region deutlich. So würde eine Affinitätsreduktion durch Konformationsänderung in mut 32 die geringfügig verminderte Färbeintensität erklären. Andererseits konnte der beobachtete Effekt durch Optimierung des Färbeprotokolls auf ein Minimum reduziert werden, so dass eine abgrenzbare, distinkte Population doppelt-positiver T Zellen mittels multipler mFab-Färbung erreicht wurde. (Abb. 11 B) Auch die Reihenfolge der zugegebenen Fab-*Streptamere* hatte anfangs Auswirkungen auf das Färbeergebnis. So war das Resultat der Doppelfärbung wesentlich besser, wenn statt mFab anti-CD4 APC zuerst das PE-konjugierte anti-CD25 mut 32 zu den Zellen gegeben wurde. Hierbei schien weniger die Reihenfolge der mFabs, als die der Konjugate von Bedeutung. Dieser Effekt jedoch fiel nach Trennung der Färbung durch mehrere Waschschrte kaum mehr ins Gewicht (Abb. 11 A). *Streptactin* und *Streptags* konnten hierbei keine Erklärung liefern, da Aufbau und Anzahl an Bindungsstellen bei beiden Konjugaten identisch sind. Möglicherweise spielte jedoch der erhebliche Größenunterschied der Fluorochrome (APC ca. 110kDa, PE ca. 240kDa) eine Rolle. So könnten ungebundene Fab-*Streptamere* mit großen PE-Konjugaten bereits während des ersten Waschschrts entfernt worden sein, die kleineren APC-Reagenzien jedoch erst nach drei Waschschrten. Auch vor kurzem nachgewiesene unspezifische Bindungen beider Konjugate mit B- und T-Zellen (Pape et al. 2011; Zeng et al. 2012) könnten zu unterschiedlich langen Verweildauern ungebundener Fab-Reagenzien und Interaktionen zwischen den beiden Fragmenten geführt haben. Schließlich würde zumindest ein Teil des Effekts auch durch verschiedene Dissoziationskonstanten ( $K_{Ds}$ ) der beiden mFabs erklärt. Vorstellbar wäre, dass anti-CD25 mut 32 aufgrund durchgeführter Affinitätsmodifikation eine niedrigere Bindungsstärke aufweisen und ungebundene bzw. unspezifisch bindende Fab-Fragmente so bereits während des ersten Waschschrts leichter gelöst würden, während die Entfernung von anti-CD4 Reagenzien weiteres Waschen benötige. Zwar sind noch keine  $K_D$ -Werte für die beiden mFabs ermittelt, doch verdeutlichen niedrige  $K_{Ds}$  humaner anti-CD4-Fab-*Streptamere* den starken Effekt einer Affinitätsmodifikation auf die Bindungsaffinität der Reagenzien (Stemberger et al. 2012).

Da während der Experimente beobachtet worden war, dass sich auch ein großes Inkubationsvolumen negativ auf die Färbeintensität der Doppelfärbung auswirkte, wurde das Volumen erheblich verringert um Resultate zu erhalten, die mit einer Antikörperfärbung vergleichbar waren. Somit konnte auch mittels mFab-Doppelfärbung die anvisierte doppelt-positive Population in ihrer geringen Frequenz detektiert und abgegrenzt werden (Abb. 11 C).

Die beschriebenen Optimierungsexperimente hatten wesentliche Parameter im Färbeprozess aufgedeckt und die Komplexität der reversiblen Doppelfärbung gegenüber mFab-Einzelfärbungen deutlich gemacht. Da diese mFab-Doppelfärbung und ihre erfolgreiche Anwendung eine essentielle

Voraussetzung für die Nutzung der murinen Fabs insgesamt darstellte, wurde das Verhalten der Färbung und insbesondere ihre Reproduzierbarkeit und Robustheit weiter untersucht. In diesem Zusammenhang sollte sichergestellt werden, dass häufige, im laboralltäglichen Umgang mit Antikörpern übliche Handgriffe sowie variable Multimerisierungszeiten auch bei Verwendung muriner reversibler Reagenzien keine Probleme bereiten würden. So zeigten Färbeexperimente mit Vortexen und/oder Zentrifugieren keinerlei Unterschiede zu unbehandelten Proben. Eine Verkürzung der Multimerisierungszeit unter 40min bzw. die direkte Inkubation von mFab und *Strep*-Tactin auf den Zellen unter Verzicht auf Multimerisierungszeit führte allenfalls zu einer geringen Abnahme der Färbeintensität – bei vollkommen intakten reversiblen Eigenschaften im Ablöseexperiment. (Abb. 12) Mit diesem Versuch konnte verdeutlicht werden, dass eine erfolgreiche Anfärbung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen unter Verwendung reversibler Reagenzien auch ohne eine vorausgehende Multimerisation der einzelnen Komponenten einer Fab-Färbung möglich war. Die Komplexbildung verlief offenbar unmittelbar bei Zusammenführung von Fab und *Strep*-Tactin und war in gemeinsamer Inkubation und Anwesenheit der Zellen möglich, ohne dass dies zu nennenswerten Verlusten bezüglich Färbequalität oder Einbußen in der Reversibilität führte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass reversible Doppelfärbungen mit den neuen murinen Multimerkonstrukten durch sequentielle Färbung und mehrere Waschstufen zufriedenstellende Ergebnisse erbrachten. Erkenntnisse aus Versuchen zur Robustheit halfen zusätzlich, mehr über die Handhabung dieser Reagenzien zu erfahren. Eine weitere Optimierung der Ergebnisse ist, wie bereits für die Einzelfärbung erläutert, auch durch weitere Etablierung und Standardisierung der Proteinexpression – z.B. durch Expression in größerem Maßstab, durch eine weitere Verbesserung der Proteinreinheit, sowie durch einen erhöhten Anteil an funktionellen Heterodimeren in der Proteinlösung– zu erwarten.

In einem nächsten Schritt wurde die etablierte Doppelfärbung zur Isolation muriner Tregs mittels FACS-Zellsortierung eingesetzt. Ziel der Experimente war der Vergleich von Fab- und Antikörper-isolierten Zellen hinsichtlich Färbequalität und Reinheit. Wie anhand repräsentativer Experimente dargestellt unterschieden sich die typischen Färbemuster doppelt-positiver Zellen weder untereinander in relevanter Weise, noch von FACS-Analysen nicht-sortierter Zellen und insbesondere nicht von Ergebnissen mAb-gefärbter Proben. Stattdessen konnten die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen klar abgegrenzt und in hoher Reinheit isoliert werden. Durchgeführte Reinheitskontrollen zeigten in Abhängigkeit der verwendeten Geräte bei reversibel gefärbten Proben zum Teil sogar höhere Reinheiten. (Abb. 13) Auch wenn Einzeldaten aufgrund verschiedener Experimente und unterschiedliche Versuchstiere in ihren Frequenzen leicht variierten und ein technisch bedingter Unterschied hinsichtlich des Färbemusters zwischen den beiden verwendeten Geräten (*Aria* und *MoFlo II*) auffiel, zeigen die Daten der reversiblen Fab-Multimer Zellsortierung ein zuverlässiges mit konventionell sortierten Zellen vergleichbares Färbesystem. Im Bezug auf die Reinheit ergaben sich sogar tendenzielle Vorteile der *Streptamere*.

Die bisher diskutierten Daten der murinen Fab-*Streptameren* anti-CD4 und anti-CD25 deuteten darauf hin, dass T-Zellen in zu Antikörper-gefärbten Kontrollen absolut vergleichbarer Qualität detektiert, Zellsortierungen in hoher Reinheit durchgeführt und die neuen Färbereagenzien auch mit großer Zuverlässigkeit wieder abgelöst werden konnten. In einem letzten Schritt der Testphase musste geklärt werden, ob diese doppelt-positiv angefärbten und isolierten Zellen tatsächlich regulatorische T-Zellen darstellten. Ein direkter Nachweis für diese Frage der Färbespezifität sollte mit Hilfe von intranukleären Foxp3 Färbungen erfolgen.

Obwohl in der Maus eine sehr enge Korrelation zwischen der Expression von CD25 und Foxp3 besteht, erlaubt die Kombination der beiden Marker CD4 und CD25 alleine keine direkte und exklusive Detektion regulatorischer T-Zellen. So sind knapp 10% aller Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen CD25<sup>-</sup> und umgekehrt finden sich ungefähr ebenso wenige Foxp3<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> Lymphozyten. Insbesondere in nicht-naiven Mäusen können mit obiger Markerkombination zahlreiche aktivierte Teff Zellen angefärbt werden (Shevach 2006). (siehe 1.2.2.1.) Ohne inflammatorisches Milieu jedoch exprimieren, wie schon bald nach Entdeckung von Foxp3 gezeigt werden konnte, nahezu alle murinen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T- Zellen auch Foxp3 (Hori 2003; Fontenot, Gavin, and Rudensky 2003). Foxp3<sup>+</sup> Anteile von >90% wurden beschrieben und mussten daher für einen Spezifitätsnachweis erwartet werden (Hilchey and Bernstein 2007). Mit Hilfe des erläuterten Kombinationsexperiments aus mFab-Streptamer Doppelfärbung, Zellsortierung, Ablösung und intranukleärer Foxp3 Färbung (Abb. 14) konnte ein solcher Anteil an Foxp3<sup>+</sup> Zellen nach mFab-sort erzielt werden. Mit >97% übertraf er jenen der Antikörper-Kontrolle und verdeutlichte somit, dass alle bisher generierten Daten mit murinen Fab-Streptameren tatsächlich auch regulatorische T Zellen beinhalteten.

Bis vor kurzem konnte davon ausgegangen werden, dass eine komplexere Dreiteilung der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Population in CD25<sup>high</sup>, CD25<sup>intermediate</sup> und CD25<sup>low</sup> nur für humane T-Zellen gelte. Hier zeigen ausschließlich CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> sortierte Zellen hohe Foxp3 Expressionsraten. Eine schwächere Korrelation zwischen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> und Foxp3 führte zur Verwendung immer weiterer Marker wie CD127 und CD45RA für positive bzw. CD49d für negative Zellsortierung um Foxp3<sup>+</sup> Anteile zwischen 92% (Shevach 2009) und >98% (Hoffmann et al. 2009) zu erhalten und sogar während in vitro Kultivierung von Tregs zu konservieren (Hoffmann et al. 2006). Unlängst konnte jedoch nachgewiesen werden, dass diese Dreiteilung der CD25 Expression auch in murinen Tregs zu finden ist (Albrecht 2009). Eine weitere Erhöhung des Anteils an reversibel isolierten Foxp3<sup>+</sup> nTregs in diesem Experiment wäre somit vermutlich durch ein strikteres gating auf CD25<sup>+</sup> high ebenfalls möglich gewesen.

Dennoch konnte die Frage nach Spezifität mit diesem Experiment in einer einfachen und nachvollziehbaren Versuchskette mit der Funktionalität der reversiblen mFab-Multimere und der Möglichkeit zur Zellsortierung von nTregs in hoher Reinheit verknüpft werden.

## FUNKTIONALITÄT mFAB-STREPTAMER MARKIERTER TREGS *IN VITRO* UND *IN VIVO*

Ein Grund für die Entwicklung muriner Fab-*Streptamere* lag in der Möglichkeit, in Vergleichsanalysen zwischen so gewonnenen murinen Tregs und konventionell gefärbten Zellen funktionelle Unterschiede aufzudecken, da bei letzteren aufgrund des Verbleibs von Oberflächenmarkern, z.B. anti-CD25 mAbs eine Störung essentieller Strukturen wie dem IL-2 Rezeptor postuliert werden konnte. (siehe 1.4.) Hinweisen auf verbesserte Vitalität und Funktion reversibel gefärbter Zellen sollte somit nachgegangen werden. Für funktionelle Betrachtungen einer möglichen positiven Auswirkung muriner *Streptamer*-Färbungen auf Tregs wurde versucht, die Proliferations- und Suppressionsfähigkeit, sowie das Überleben mAb- und mFab-gefärbter Tregs in verschiedenen Mausmodellen zu vergleichen.

Eine Möglichkeit die suppressiven Eigenschaften regulatorischer T Zellen *in vitro* zu untersuchen bietet der weitgehend anerkannte *Suppression Assay*. In einem Vergleich mAb- und mFab-gefärbter Zellen wurde der mögliche suppressive Vorteil für Letztere analysiert. Die gewonnenen Daten konnten zwar innerhalb einzelner Experimente einen geringfügig höheren suppressiven Effekt reversibel behandelter Tregs zeigen, der sich zum Teil auch über alle Titrationsstufen konstant verhielt. Die detektierte Tendenz konnte statistisch jedoch nicht untermauert werden – unter anderem aufgrund der nur geringen für einzelne Experimente verfügbaren Zellzahlen. (Abb. 15) Auffällig waren neben den vergleichbaren Suppressionseffekten ein hoher Anteil an toten Zellen, ebenso wie allgemein geringe Proliferationsraten. Selbst in den polyklonal stimulierten Positiv-Kontrollen zeigten maximal 50% der Tresp Zellen mehr als einen Teilungsschritt, während unter vergleichbaren Bedingungen Proliferationsraten von >80% erwartet werden können, wie mehrfach gezeigt wurde (Stemberger et al. 2012; Hilchey and Bernstein 2007; Albrecht 2009). Diese Ergebnisse und ihre generelle Aussagekraft können auf verschiedene Arten diskutiert werden, da *Suppression Assays* zwar breite Anwendung finden, ihre zahlreichen Varianten und zum Teil diskrepanten Resultate jedoch durchaus kritisch betrachtet werden (Shevach 2009).

So können neben der Möglichkeit einer durchflusszytometrischen Messung der Proliferation mittels CFSE bzw. eFluor® 670 Suppressionsexperimente auch mittels Messung von <sup>3</sup>H-Thyidin-Einbau durchgeführt werden. Hier wurde gezeigt, dass die Suppressions- bzw. Proliferationsraten von der Art der aCD3 Applikation (löslich vs. plattengebunden) abhingen. Doch bleiben die Ergebnisse zur plattenengebundene aCD3 Stimulation widersprüchlich (Albrecht 2009; Baecher-Allan, Viglietta, and Hafler 2002). In den hier gezeigten Experimente wurde lösliches aCD3 verwendet. Weiterhin ist beschrieben, dass ein alleiniger aCD3 Stimulus zu starker Suppression führt, während die zusätzliche Gabe von aCD28 diesen Effekt wieder kompensieren kann. Offenbar werden Tresp über CD28 Aktivierung und IL-2 Expression so stark stimuliert, dass sie für eine Suppression durch Tregs unempfindlich werden. Die Aufhebung der Suppression ist hierbei auf die Konkurrenz von CD28 mit CTLA-4 zurückzuführen, welches ansonsten die IL-2 Produktion über CD80/86 hemmen und die damit verbundene Tresp Aktivierung verhindern kann (Maloy and Powrie 2001; Misra et al. 2004; Thornton and Shevach 1998; Thornton, Piccirillo, and Shevach 2004; Joly and Hudrisier 2003).



Daher wurde die polyklonale Stimulation allein mittels anti-CD3 durchgeführt. Auch die empfohlene Menge an Stimulus variiert in der Literatur erheblich (Shevach 2009; Stemberger et al. 2012; Hilchey and Bernstein 2007; Albrecht 2009). Die hier gewählte Konzentration jedoch liegt innerhalb dieser Spannweite und sollte sich daher nicht entscheidend auf die gezeigten Ergebnisse ausgewirkt haben. Eine weitere Variable von *Suppression Assays* betrifft die verwendeten APCs. So wurden die gezeigten Daten mit autologen CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen in gängiger Anzahl durchgeführt, hätten jedoch um Versuche mit zusätzlichen allogenen APCs erweitert werden können um z.B. der in vivo Situation nach allogener Knochenmarkstransplantation näher zu kommen – ein Beispiel für das die erfolgreiche Treg-vermittelte Suppression bereits gezeigt wurde (Albrecht 2009). Demgegenüber stehen Beobachtungen, wonach APCs für die Funktion von Tregs in vitro eine untergeordnete Rolle spielen (Albrecht 2009; Onishi et al. 2008). (siehe 1.2.2.3.) Des Weiteren wirkt sich die Auswahl der Tresp Zellen auf das Resultat von *Suppression Assays* aus, je nachdem ob es sich um ein Gemisch aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen oder nur um eine der beiden Populationen handelt. So haben eingesetzte Tregs eine stärkere suppressive Wirkung auf CD4<sup>+</sup> Zellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> Zellen durch Tregs kaum in der Proliferation, sehr wohl jedoch in ihrer zytotoxischen Funktion gehemmt werden (M.-L. Chen et al. 2005). Eine nach CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tresp getrennte Analyse der hier besprochenen Daten betätigte die stärkere Proliferation der CD8<sup>+</sup> Zellen, zeigte jedoch keine deutlicheren Unterschiede in der Suppression zwischen mAb- und mFab-gefärbten Tregs. (Daten nicht gezeigt) Bezüglich der Rolle von IL-2 in *Suppression Assays* gibt es schließlich ebenfalls unterschiedliche Interpretationen. Lange Zeit wurde angenommen, IL-2 müsse eine entscheidende Rolle für die suppressive Funktion von Tregs spielen – beispielsweise durch den Verbrauch von verfügbarem IL-2 und die damit verbundene Proliferationshemmung von Tresp Zellen (Pandiyan et al. 2007; la Rosa et al. 2004). Inzwischen jedoch scheint diese Annahme überholt und eine Rolle von IL-2 für die Suppression überschätzt (Shevach 2009; Tran et al. 2009; Shevach et al. 2006). Andererseits bleibt unklar inwieweit IL-2 *in vitro* die Suppressionsfähigkeit von Tregs unterdrückt. So führen große Mengen an IL-2, die in *Suppression Assays* von stimulierten Tresp sezerniert werden zu einer Proliferation der Tregs (Thornton et al. 2004; Dieckmann et al. 2001). Über die Folgen wiederum gibt es widersprüchliche Daten. So führten Kostimulationen mit IL-2 und anti-CD28 in einigen Fällen zu einem Verlust des suppressiven Potenzials (Thornton, Piccirillo, and Shevach 2004; Takahashi et al. 1998)<sup>185</sup>, während in anderen die Funktion der Tregs trotz Proliferation nach IL-2 Gabe erhalten blieb (Hoffmann et al. 2006; Shevach 2009). Träfe in den hier durchgeführten Experimenten erstes zu, so könnte daraus geschlossen werden, dass eine Blockade des IL-2 Rezeptors durch anti-CD25 einen IL-2 getriggerten Verlust der Suppressionsfähigkeit verhindert hätte. Somit wäre der vermeintliche Nachteil der konventionell gefärbten Tregs gegenüber den reversibel behandelten Zellen kompensiert, was sich in einem annähernd vergleichbaren Suppressionsergebnis beider Gruppen niederschläge. Träfe letzteres zu, so könnte der Effekt von IL-2 in den hier gezeigten *Suppression Assays* vernachlässigt werden. Aufgrund der oben

erwähnten Hinweise, wonach die Bedeutung von IL-2 für die Funktion von Tregs fraglich erscheint, da trotz Blockade des IL-2 Rezeptors die Suppressionsfähigkeit von Tregs bestehen bleiben kann (Tran et al. 2009), lassen sich beide Argumentationslinien in die jeweils andere überführen.

Neben diesen prinzipiellen Fragen bezüglich des *Suppression Assays* können technische Schwächen zu uneindeutigen Ergebnissen beigetragen haben. So könnte eine Verunreinigung eingesetzter Tregs durch aktivierte Teff Zellen (CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>), welche sich in Kultur, stimuliert durch IL-2 aus Tresp Zellen differenzieren, den suppressiven Effekt verfälschen (Shevach 2009). Aufgrund des bereits erläuterten Nachweises der Färbespezifität von Fab-Multimeren (Abb. 14) kann jedoch von einer nahezu reinen Treg-Population ausgegangen werden, die für diese Versuche in Kultur genommen wurden. Des Weiteren ließen sich die Ergebnisse einzelner Suppression Assays aufgrund großer Schwankungsbreiten nur schwer miteinander vergleichen. Insbesondere bei Titrationen bis 1:128 (Tregs : Tresp), erwies es sich als problematisch Ungenauigkeiten im Titrationsverhältnis sowie bei absoluten Zellzahlen, bedingt durch die Unschärfe von Pipettier- und Zählritten, einzugrenzen. Daneben erlaubte es die limitierte Zahl an sortierten Tregs nicht immer vollständige Titrationsreihen durchzuführen. Dass gerade die Titrationsschritte am unteren Ende der Reihe von Interesse wäre, lassen die in Abb. 15 dargestellten Ergebnisse vermuten. Hier wird deutlich, dass sich der suppressive Vorteil reversibel gefärbter Tregs ab einem Verhältnis 1:32 tendenziell verstärkt. Diese Beobachtung stützt die Theorie, dass authentische, mittels reversibler Fab-Streptamer-Färbung gewonnene Zellen bereits in geringen Mengen Effekte generieren, die mit konventionell markierten Populationen erst bei größeren Zellzahlen zu Tage treten.

Um in zukünftigen Untersuchungen methodisch bedingte Schwankungen bei kleinen Zellzahlen zu minimieren und ein höheres Maß an Standardisierung zu erlauben, könnte die Zellsortierungen für *Suppression Assays* alternativ direkt in 96-well Platten erfolgen.

Neben zahlreichen offenen Fragen und den beschriebenen Schwierigkeiten blieb ungeklärt, ob ein *in vitro* eventuell nur moderater Funktionalitätsunterschied durch den Einfluss oberflächengebundener Färbereagenzien mittels *Suppression Assay* überhaupt darzustellen war. Daher wurde ein alternatives System etabliert um den Fokus von *in vitro* Suppression, welche nicht allein von markerfreien IL-2 Rezeptoren auf Tregs abhängig ist (Hoffmann et al. 2006; Shevach 2009) (siehe 1.2.2.3.) auf *in vitro* Proliferation zu verschieben und dabei einen eventuell proliferationsfördernden Effekt nicht-blockierter CD25 Moleküle auf sortierten Tregs zu untersuchen.

Für die Homöostase und Proliferation von Tregs ist IL-2 von zentraler Bedeutung, da es unter anderem über STAT-5 zur Aufrechterhaltung der Foxp3 Expression und somit einem stabilen Phänotyp beiträgt (Wuest et al. 2008). Und anders als bei *in vitro* Suppression zeigen bisherige Daten zu dieser für Überleben und Proliferation der Tregs essentiellen Bedeutung von IL-2 ein einheitlicheres Bild. So konnte nachgewiesen werden, dass IL-2 defiziente Mäuse eine geringere Anzahl an Tregs besitzen, IL-2 in der Entwicklung und Expansion dieser Zellen essentiell ist und eine IL-2 Neutralisation *in vivo* zu

Autoimmunerkrankungen führt (Sakaguchi, Wing, and Miyara 2007; Setoguchi 2005; Cheng et al. 2013).

Auf diesen Aspekt konzentriert, sollte ein einfaches und im experimentellen Ablauf mit weniger Variablen behaftetes Proliferationsexperiment allein das Zellwachstum mAb- bzw. mFab-gefärbter sortierter Tregs unter Einfluss von IL-2 vergleichen. Auch hier war im Falle reversibel gefärbter Tregs eine leicht erhöhte Proliferationsrate zu beobachten. Diese könnte damit erklärt werden, dass IL-2 Rezeptoren reversibel gefärbter Zellen nach Ablösung der *Streptamer*-Reagenzien im Gegensatz zu denen der Antikörper-Kontrolle nicht mehr blockiert sind, wobei sich ihre nun höhere Empfänglichkeit für einen IL-2 Stimulus in stärkerer Proliferation niederschlägt. (Abb. 16) Der Unterschied in der Zellfunktion zeigte sich zwar mit weniger Variationsbreite, blieb aber trotz allem gering. Auch dieser Assay zeigte insgesamt niedrigen Proliferationsraten. Da hier im Gegensatz zum *Suppression Assay* keine IL-2 sezernierenden Tresp Zellen vorhanden waren, konnte nur exogenes IL-2 als Wachstumsstimulus wirken. Abweichend von Literaturangaben wurden im vorgestellten Experiment deutlich geringere Mengen an IL-2 zugegeben um bei gerade noch messbare Proliferation den Unterschied zwischen mAb- bzw. mFab-behandelten Tregs optimal herauszuarbeiten. Titrationsversuche mit größeren Mengen an IL-2 hatten zwar höhere Proliferationsraten zur Folge, konnten Unterschiede jedoch nicht verdeutlichen. (Daten nicht gezeigt)

Suppressions- und Proliferationsdaten aus den beschriebenen *in vitro* Assays lassen jedoch nicht ohne Weiteres auf das Verhalten von Tregs *in vivo* schließen (Miyara et al. 2011). In einem physiologischen Umfeld ist, wie bereits erläutert (siehe 1.2.2.3.), noch weitgehend unklar, inwieweit direkte Suppression von Treg Zellen eine zentrale Rolle spielt, wie groß der Einfluss von IL-2 auf die suppressive Funktion von Tregs tatsächlich ist und ob *in vivo* nicht ein anderes proliferatives Verhalten (Shevach 2009) und die Interaktion mit DCs für den immunmodulatorischen Effekt von Tregs im Vordergrund stehen (M.-L. Chen et al. 2005; Mempel et al. 2006; DiPaolo et al. 2005; Tadokoro 2006; Tang et al. 2006). Daher sollte ungeachtet der nur geringen Unterschiede *in vitro* auch das Verhalten reversibel gefärbter Tregs nach adoptivem Zelltransfer *in vivo* betrachtet werden. Hierzu wurden der adoptive Transfer von Zellen – sortiert oder als Milzzellfraktion – mit oder ohne Antikörperbehandlung in verschiedene Mausmodelle angestrebt, um das Überleben und die Proliferationsfähigkeit der Tregs *in vivo* zu überprüfen.

Erste Transfers kompletter Milzfraktionen mit oder ohne Antikörperbehandlung sollten *in vivo* einen potentiellen Nachteil für gefärbte Zellen aufgrund blockierter Oberflächenstrukturen – insbesondere des IL-2 Rezeptors – untersuchen, welcher sich in geringerer homöostatischer Proliferation der Tregs niederschlagen konnte. Eine Analyse 8 Tage nach Transfer zeigte eine kaum detektierbare Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen innerhalb der transferierten Populationen. Ein Unterschied in der Gesamtfrequenz oder dem Foxp3 Anteil von Antikörper-gefärbten und unbehandelten Zellen wurde dabei nicht festgestellt. Eine Ursache für das ausgebliebene Wachstum der transferierten Tregs könnte ein Mangel an

freien Zellkompartimenten sein. Eine damit erhöhte Konkurrenz um Aktivierungs- und Wachstumsfaktoren, sowohl innerhalb der transferierten Milzzellfraktion, als auch mit endogenen Wirtszellen könnte die Expansion verhindert haben, ohne welche ein eventueller Vorteil für unbehandelte Tregs nicht zum Tragen gekommen wäre. Während sich diese *in vitro* durch Anergie auszeichnen und nicht auf TCR-Stimuli reagieren, konnte wiederholt gezeigt werden, dass Tregs *in vivo* ebenso mit Expansion auf Antigen-Kontakt reagieren, wie andere CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vermutlich ermöglicht erst ein permanenter TCR-Stimulus über Komplexe aus „Selbst“-Antigen und MHC-II die suppressive Funktion von Tregs *in vivo* (Shevach 2009; Shevach 2006). Des Weiteren ist wie bereits erläutert auch IL-2 für die Homöostase *in vivo* essentiell (Yu et al. 2009). Das gezeigte Transferexperiment erfolgte in naive Mäuse. Eine nachträgliche Immunisierung mit Antigen wurde nicht durchgeführt. Die mangelnde Zellproliferation ließe sich also sowohl auf zu geringe TCR-Stimuli, als auch auf einen absoluten – bzw. durch Konkurrenz relativen – Mangel an Faktoren wie IL-2, IL-7 oder TGFβ zurückführen (Simonetta et al. 2012).

Um Letzteres zu umgehen wurden Zelltransfers nach durchflusszytometrischer Sortierung von Tregs durchgeführt, nachdem zuvor in Vergleichsexperimenten zwischen mAb-gefärbten Milzzellfraktionen und mittels mAbs sortierte Tregs nach Transfer keine Unterschiede bezüglich des Überlebens gefunden wurden und daher wesentliche Einflüsse durch die FACS-Sortierung selbst vernachlässigt werden konnten. Erste Transfers reversibel gefärbter Tregs zeigten erneut wenig Wachstum und kaum Unterschiede in der Proliferation, verglichen mit Antikörper-Kontrollen. (Abb. 17) Somit konnte eine postulierte Konkurrenz innerhalb von transferierten Milzzellfraktionen zumindest nicht als alleinige Erklärung für geringe Zellproliferation herangezogen werden. Bereits vor Entdeckung von Foxp3 wurden jedoch in Untersuchungen zur homöostatischen Proliferation bei Transfer CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen in naive C57BL/6 ähnliche Beobachtungen gemacht (Gavin et al. 2001).

Da homöostatische Proliferation am besten unter lymphopenen Bedingungen beobachtet werden kann (Ge et al. 2001; Cho et al. 2000), wurden sortierte Tregs in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert. So konnte die Hypothese eines notwendigen freien Kompartiments für die Expansion transferierter Tregs untersucht werden. Allerdings zeigte sich trotz hoher Reinheiten nach Zellsortierung und großer Anzahl an transferierten Zellen kaum Proliferation – weder bei reversibel noch bei konventionell gefärbten Tregs. (Abb. 17) RAG<sup>-/-</sup> Mäuse besitzen aufgrund ihrer Mutation innerhalb der *recombination activating genes* (RAGs) weder B- noch T-Zellen und eignen sich für zahlreiche autoimmunologische Modelle und Experimenten mit adoptivem Transfer von Tregs. So konnte gezeigt werden, dass in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen induzierte Kolitis oder Diabetes mellitus mit Hilfe transferierter Tregs gelindert bzw. geheilt werden konnte (Sarween et al. 2004; Mottet, Uhlig, and Powrie 2003). Allerdings trafen transferierte Tregs bei diesen Experimenten auf ein inflammatorisches Milieu und die Stimulation durch Teff Zellen. Im Gegensatz dazu fehlten bei Treg-Transfers in naive RAG<sup>-/-</sup> Mäuse unter Umständen notwendige TCR-Aktivierung und IL-2 Sekretion durch Teff Zellen, welche beide *in vivo* anders als *in vitro* ein starkes

Proliferationssignal darstellen (Walker et al. 2003; Sakaguchi 2005; Maloy and Powrie 2001). Des Weiteren gab es eventuell auch hier keine ausreichende Nische für die transferierten Tregs, falls der postulierte Freiraum mangels endogener B und T Zellen bereits durch andere Teile des Immunsystems ausgefüllt war. Allerdings stellt die RAG<sup>-/-</sup> Maus ein allgemein anerkanntes Modell für Zelltransfers und homöostatische Proliferation verschiedener T-Zellpopulationen dar. Trotz Mangel an T-Zellen und somit dem Fehlen einer wichtigen IL-2 Quelle konnte auch für Tregs eine Expansion nach adoptivem Transfer in naive RAG<sup>-/-</sup> Mäuse nachgewiesen werden (Gavin et al. 2001; Simonetta et al. 2012). Es muss daher von nicht-hämatopoetischen IL-2 Quellen ausgegangen werden, da in bestrahlten RAG<sup>-/-</sup> Mäusen nach Rekonstitution mittels IL-2<sup>-/-</sup> Knochenmark CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen gefunden wurden (Nelson 2004). Dass die hier präsentierten Daten dennoch kaum Proliferation zeigen könnte mit der applizierten Zellzahl zusammenhängen. So wurden bewusst nur 2x10<sup>5</sup> Tregs mit der Idee transferiert, einen Unterschied für reversibel behandelte Zellen bei niedrigen Mengen sichtbar zu machen. Im Gegensatz hierzu finden sich in der Literatur Transfers mit 1 – 2x10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen (Gavin et al. 2001; Simonetta et al. 2012). Die weitere Optimierung dieses Modells mit größeren Transferzahlen soll zukünftig ebenso versucht werden, wie die Zusammenführung von *in vivo* Beobachtung homöostatischer Proliferation und *in vitro* *Suppression Assay*. So konnte bereits wiederholt gezeigt werden, dass Teff Zellen, die nach Transfer in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen Kolitis und *wasting disease* hervorrufen durch Gabe von Tregs supprimiert werden konnten (Annacker et al. 2001; Shen et al. 2005).

Bis dahin könnten andere Immundefizienz-Modelle wie die NOD/Scid Maus Alternativen bieten. Dieser Hybrid aus Non-obese diabetic (NOD) Maus und der schweren kombinierten Immundefizienz „Scid“ (*severe combined immunodeficiency*, verursacht durch eine Mutation im *Prkdc<sup>scid</sup>* Locus) zeichnet sich nicht nur durch fehlende funktionelle B- und T-Zellen aus, sondern besitzt zudem weder intakte NK-Zellen noch ein vollständig funktionales angeborenes Immunsystem – aufgrund niedriger Makrophagen- und Granulozytenzahlen sowie fehlendem Komplement (Shultz et al. 1995; Lock 2002). Für humane Zellen konnte schon früh nachgewiesen werden, dass Lymphopenie-induzierte homöostatische Proliferation in NOD/Scid Mäusen stattfindet. So führte der Transfer von CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut zu einer kompletten Wiederherstellung funktioneller B-, T- und NK-Zellen (Hiramatsu 2003). Daher könnte das Problem des freien Zellkompartiments beim Transfer muriner Tregs im NOD/Scid Modell eventuell besser untersucht werden als in C57BL/6 oder RAG<sup>-/-</sup> Mäusen. Auch eine Verbindung von Transfers kompletter Milzfractionen, NOD/Scid und relevanten Autoimmunphänomenen wie GvHD (siehe unten) wäre denkbar. So ist beschrieben, dass Transfers alloreaktiver BL/6 Milzfractionen in NOD/Scid Mäuse bei vorausgegangener CD25-Depletion letale GvHD zur Folge hatte, während dies nicht der Fall war, solange sich innerhalb der transferierten Fraktion CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen befanden (Kitazawa et al. 2007). Ein Vergleichstransfer zwischen CD25-depletierten, anti-CD25 mAb gefärbten, anti-CD25 mAb gefärbten und unbehandelten

Milzfractionen könnte aufgrund der genannten Vorteile des Modells – und daher unter Umgehung bisher aufgetretener Probleme – zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Ein für die Proliferation transferierter Tregs eventuell hinderlicher Mangel an Stimulation in RAG<sup>-/-</sup> oder NOD/Scid Mäusen könnte durch autoimmunologische Mausmodelle wie der RIP-mOVA Maus umgangen werden. Diese Mäuse exprimieren Ovalbumin (OVA) über den *rat insulin promoter* (RIP) auf den Beta-Zellen des Pankreas, sodass es bei Transfer von OVA-spezifischen T Zellen zu einer Induktion von Diabetes kommt. Durch Zugabe von Tregs wird zwar die Expansion der transferierten OVA-spezifischen T Zellen nicht gebremst, jedoch konnte bereits eine Infiltration der Beta-Zellen und die Differenzierung zu Teff Zellen verhindert und so eine Manifestation der Krankheit gestoppt werden (Shevach 2009). Auf einem RAG<sup>-/-</sup>-Hintergrund könnte dieses Mausmodell, analog zu erwähnten Kolitis-Modellen, sowohl das Problem des freien Kompartiments, als auch der fehlenden Stimulation lösen. So böte es in einem Vergleich von transferierten Tregs nach Antikörper- bzw. Fab-*Streptamer* Färbung eine Möglichkeit, die postulierten funktionellen Vorteile der reversiblen Färbung an einem Krankheitsmodell mit Blutzuckerspiegel als einfach zugänglichem *read-out* zu demonstrieren. Leider standen beide Modelle im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung und konnten auch aus zeitlichen Gründen nicht mehr realisiert werden.

Stattdessen wurde parallel zu den erläuterten Versuchen mit RAG<sup>-/-</sup> Mäusen ein vergleichender Transfer in das zur Verfügung stehende DEREK-Mausmodell angestrebt. (siehe 2.6.1.) In diesem System, mit dessen Hilfe hochspezifisch und bei ansonsten intaktem immunologischen Milieu alleine die Population der regulatorischen T-Zellen depletiert und damit selektiv ein freies Kompartiment für exogene Tregs geschaffen werden kann, bestand die Hoffnung auf ausreichend starke Expansion der transferierten Zellen und die Möglichkeit zur Untersuchung *Streptamer*-isolierten Zellen.

Erste Resultate von Transfers reversibel bzw. konventionell gefärbter Tregs nach durchflusszytometrischer Sortierung und DT-Depletion der DEREK-Mäuse erbrachten jedoch erneut nur geringe Proliferationsraten. Die Ergebnisse ähnelten in Frequenz und Zellzahl denen nach Transfer in naive C57BL/6. Ebenso wenig zeigte sich ein Unterschied zwischen reversibel- und Antikörper-gefärbten Zellen. Stattdessen legten die Daten die Vermutung nahe, dass keine vollständige Depletion der endogenen Tregs stattgefunden hatte. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden weitere Analysen von Kinetik und Vollständigkeit der DT-Depletion durchgeführt. Diese Analysen ergaben zum einen, dass die Depletion der eGFP<sup>+</sup> transgenen Tregs wie erwartet schnell, vollständig und zuverlässig funktionierte. Dennoch wurde eine auch CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> Population entdeckt. (Abb. 18) Offenbar handelte es sich hierbei um Tregs ohne den eGFP-gekoppelten Diphtherietoxinrezeptor (DTR), die für eine DT-Depletion unerreichbar blieben – und diese Population stellte insgesamt betrachtet 0,8% aller CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>-</sup> Zellen der untersuchten DEREK Maus. Dies war ein bekanntes, diskutiertes Problem im DEREK Mausmodell und war auf eine nicht vollständige oder unspezifische Expression des BAC (*bacterial artificial chromosome*) basierten Transgens zurückzuführen. Jedoch sollte dies bei nur

kurzzeitigen Experimenten von bis zu 3 Wochen kein Problem darstellen. Allein von Langzeitversuchen mit diesem DEREK Mausmodell wurde explizit abgeraten, da eGFP<sup>-</sup> Tregs nach DT-Depletion mit der Zeit durch starke Proliferation die frei gewordene Nische wieder auffüllen und zu einer neuen endogenen Treg-Population regulärer Größe expandieren würden, die nun jedoch nicht mehr transgen und damit nicht zu depletieren sei (Lahl and Sparwasser 2011). Es stellte sich die Frage, ob dieses Szenario in den hier erläuterten nur 8-tägigen Experimenten wider Erwarten bereits eingetroffen war. Um der Frage nachzugehen, wurde das Verhalten der genannten Zellpopulation in einer Depletionskinetik verfolgt. Die Ergebnisse der Analyse verdeutlichten zum einen erneut eine erfolgreiche und vollständige Depletion der eGFP<sup>+</sup> Zellen und dies bereits nach gut 24 Stunden. Zum anderen zeigte sie jedoch auch, dass der Anteil an Foxp3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der beobachteten eGFP<sup>-</sup> Population von genannten 0,8% vor DT-Gabe auf 12,9% nach Depletion angestiegen war und demnach wieder den Treg-Frequenzen naiver Mäuse entsprach. Diese neuen Daten bestätigten die Vermutung, dass eine vollständige Depletion der endogenen Tregs in den verwendeten DEREK Mäusen nicht erreicht werden konnte und somit auch das erhoffte selektiv freie Kompartiment für Zelltransfers nicht gesichert war – und dies auch bei einem Experiment von nur kurzer Dauer.

Um das DEREK Modell dennoch verwenden zu können, wurde versucht das Problem zu umgehen. Indem in neuen Experimenten Treg-Transfer und DT-Gabe unmittelbar aufeinanderfolgten, sollte eine Etablierung der transferierten Zellen in dem kurzen Zeitfenster zwischen ausreichend fortgeschrittener Depletion der transgenen und beginnender Proliferation der DT-insensitiven, endogenen Tregs ermöglichen werden. Hierdurch konnte zwar im Vergleich zu Transfers *nach* DT-Depletion das Verhältnis von endogenen zu transferierten Foxp3<sup>+</sup> Zellen zugunsten letzterer verschoben werden, dennoch überwog die Zahl der endogenen eGFP<sup>-</sup> Tregs weiterhin. Mangels ausreichender Zellproliferation konnte sich hier abermals kein signifikanter Unterschied zwischen mAb- und Fab-gefärbten Tregs entwickeln. (Abb. 18) Weitere Variationen des Transfer-Experiments wurden – auch aus Zeitgründen – daher nicht mehr verfolgt.

Unbeantwortet bleibt die Frage, wo die Ursache für die Inkongruenzen zwischen den hier erläuterten Daten und der Beschreibung der DEREK Maus (Lahl and Sparwasser 2011) zu suchen sind. So entsprach die Durchführung der Experimente durchwegs den Empfehlungen der Autoren, wobei insbesondere auf die nur kurze Dauer von Depletion und Versuch geachtet wurde, um ein freies spezifisches Kompartiment sicherzustellen. Dass dies dennoch nicht der Fall war, muss zu der Annahme führen, dass entweder gerade die für diese Arbeit verwendeten Mäuse nicht mehr geeignet waren, oder aber das DEREK Mausmodell als solches einer genaueren Analyse – insbesondere die nicht vollständige Expression des Transgens und die Kinetik eGFP<sup>-</sup> Tregs betreffend – unterzogen werden sollte.

Nachdem mit der DEREK Maus nicht das optimale Modell zur Analyse *Streptamer*-isolierter Tregs gefunden wurde, muss für zukünftige Experimente nach Alternativen gesucht werden. Eine naheliegende Möglichkeit die Idee des spezifischen freien Treg-Kompartiments weiter zu verfolgen bietet das Foxp3<sup>DTR</sup>

Mausmodell (Kim, Rasmussen, and Rudensky 2006). Damit können endogene Tregs analog zur DEREK Maus durch DT-Injektion depletiert werden. Der Unterschied besteht hier im genetischen Hintergrund, da es sich hierbei um einen *knock-in* innerhalb der 3'-UTR von Foxp3 bestehend aus humanem DTR, GFP und einer IRES (*internal ribosome entry site*) Sequenz handelt. Eine im Vergleich zum BAC-transgenen DEREK Mausmodell vollständigere und länger anhaltende Depletion wäre zu erwarten (Durant et al. 2013).

Neben diesem Modell und der bereits erwähnten RIP-mOVA Maus soll ein weiteres Krankheitsmodell aufgegriffen werden, mit welchem die Funktionalität reversibel gefärbter Tregs nicht nur anhand von Proliferation und Suppression gemessen, sondern in ihrer tatsächlichen Wirkung auf autoimmunologische Krankheitsprozesse beobachtet werden kann. Eine solche Möglichkeit bietet das zur Verfügung stehende GvHD Mausmodell. Hier werden BALB/c Empfängermäuse letal bestrahlt und in der Folge einer allogenen Knochenmarkstransplantation aus T Zell-depletiertem Material von C57BL/6 Mäusen unterzogen. Nach dem Transfer von C57BL/6 CD4+CD25- T-Zellen entwickeln die Empfängermäuse eine GvHD, an der sie versterben. Es wurde mehrfach gezeigt, dass ein adoptiver Kotransfer von C57BL/6 Tregs vor dem Ausbruch einer GvHD schützen kann (siehe 1.3.1.) (Hoffmann et al. 2002). Ziel wäre es hier, wie auch bei RIP-mOVA und NOD/Scid, in einem vergleichenden Treg-Transfer reversibel und Antikörper-gefärbte regulatorische T Zellen in ihrem inhibitorischen Potenzial einem inflammatorischen Prozess gegenüber zu beobachten.

Bisher wurden erste Vorversuche zur Etablierung des GvHD Modells durchgeführt, in denen eine GvHD stabil provoziert und ihr Verlauf mittels *monitoring* von Gewichtsverlust, Haut- und Fellveränderungen beobachtet werden konnte. Leider war es innerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht mehr möglich erste vergleichende Transfer-Experimente zu beginnen.

## AUSBLICK

Die in dieser Arbeit vorgestellten murinen Fab-*Streptamere* gegen CD4 und CD25 ermöglichen eine Anwendung auf dem Niveau konventioneller Antikörperfärbungen und darüber hinaus. Unbestritten bleiben dabei die prinzipiellen Vorteile dieser Färbe-Technologie, die – wenn auch nicht Hauptgegenstand dieser Arbeit – bei Bewertung der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden dürfen, da Sie vor allem in zukünftigen Zelltherapieansätzen zum Tragen kämen. So ist eine unabdingbare Voraussetzung bei der Isolierung von Tregs zu therapeutischen Zwecken die höchstmögliche Reinheit, um eine Anwendung ohne Gefährdung des Patienten durch CD25+ potentiell alloreaktive Treg Zellen sicherzustellen – derartige Reinheiten werden nur durch positive Anreicherung erzielt. Jedoch sind notwendige mehrstufige positive Anreicherungen mittels magnetischer Partikel (MACS) aus methodischen Gründen bisher wenn überhaupt nur sehr eingeschränkt möglich. Solche Multiparameter-Isolierungen stellen zwar kein Problem für durchflusszytometrische Verfahren dar, diese wiederum unter GMP-Bedingungen in die klinische Anwendung zu transferieren erfordert aber



erheblichen Aufwand (Stemberger et al. 2012). Schließlich erscheint auch die immer wieder anvisierte negative Anreicherung (Kleinewiefeld et al. 2009) aufgrund niedrigerer Reinheiten und erheblichem Kostenaufwand für die eingesetzten depletierenden Antikörper als Lösung nicht optimal. Die Technologie der reversiblen *Streptamer*-Färbung bietet allerdings Möglichkeiten der Anreicherung und Isolierung von Tregs, welche die Vorteile positiver mit serieller Anreicherung verbindet und die geschilderten Probleme damit umgehen kann (Stemberger et al. 2012).

Ein weiteres intrinsisches Problem der konventionellen Antikörperfärbung sowie der Behandlung mit paramagnetischen *beads* besteht im Beladen wichtiger Oberflächenstrukturen der Zielzellen mit Fremdkörpern – und dies umso mehr, je komplexer die notwendige Markerkombination. Dass dieser Umstand bei Transfer von Zellmaterial in Patienten zahlreiche regulatorische Hürden mit sich bringt (Attarwala 2010), ist hierbei nur eines der Hindernisse. Es muss auch der Frage nachgegangen werden, inwieweit eine Antikörperfärbung oder *bead*-Behandlung von Zellen diese selbst beeinflussen, in ihrer Funktion beeinträchtigen oder gar völlig verändern kann. Funktionseinbußen und Beeinträchtigungen in der Lebensdauer der Zellen durch blockierte, aktivierte oder internalisierte Oberflächenmoleküle sind denkbar. Da sich Hinweise hierzu häufen, wurden Relevanz und Folgen dieser Problematik auch an den hier vorgestellten murinen Fab-*Streptameren* untersucht (Kjer-Nielsen et al. 2004; Chatenoud 2003; Kohm et al. 2006; Knabel et al. 2002). (siehe 1.4.)

Die hierzu in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse vergleichender *in vitro* und *in vivo* Versuche erlauben noch keine eindeutigen Aussagen. Doch sollen Experimente in dieser Richtung fortgeführt werden – nicht zuletzt da neben bisherigen Hinweisen zu den postulierten Nachteilen konventioneller Färbe- und Anreicherungsverfahren nach Abschluss dieser Arbeit weitere Daten generiert wurden, die einen funktionellen Unterschied zwischen reversibel und konventionell gefärbten Zellen weiter unterstreichen. So zeigen aktuelle *in vitro* Experimenten unserer Arbeitsgruppe zu *cell signalling* durchaus einen Einfluss der Antikörperbindung insbesondere von CD25 auf Aktivierungsprozesse. Und auch weitere Daten aus durchgeführten *Suppression Assays* verdeutlichen die hier vorgestellten Tendenzen einer höheren suppressiven Effizienz und Vitalität von reversibel behandelten Tregs (Daten nicht gezeigt). Existiert also der postulierte Einfluss auf die Funktionalität der Zellen? Könnte die Tatsache, dass essentielle Oberflächenstrukturen wie CD4 oder der IL-2 Rezeptor nach Ablösung einer Fab-*Streptamer* Färbung sozusagen unberührt zurückgelassen werden, die Effektivität von Tregs erhöhen? Wie viele reversibel gefärbte Zellen wären nötig um z.B. eine GvHD zu unterdrücken, wie viele nach Antikörper-Färbung? Gibt es Grenzwerte für mindestens nötige Zellzahlen? Und kann bei reversibler Färbung mit weniger Material einer so kleinen Zellpopulation derselbe immunmodulatorische Effekt erreicht werden? Die angeführten Daten legen dies nahe, doch ist eine exakte Beantwortung dieser Fragen unumgänglich auf dem Weg einer klinischen Nutzung reversibler Reagenzien, welche das Ziel bleiben soll.

Das Potential regulatorischer T-Zellen nämlich ist groß und das Spektrum therapeutischer Ansätze heute bereits sehr breit. (siehe 1.3.1.) Dennoch könnten in naher Zukunft insbesondere in zwei Bereichen die vermutlich größten Fortschritte hin zu einer ersten klinischen Anwendung erzielt werden. Als ein Hauptziel gilt die Transplantationsforschung und hier vor allem die Behandlung alloimmunologischer Phänomene wie GvHD (Riley, June, and Blazar 2009). Ein weiteres bilden CEDs sowie Diabetes mellitus Typ 1, da insbesondere für letztere Erkrankung im Mausmodell vielversprechende Ergebnisse mit Treg-Transfers gezeigt werden konnten und die erste Phase 1 Studie mit *ex vivo* expandierten regulatorischen T Zellen bereits angelaufen ist (Szanya et al. 2002; Tang et al. 2004; Tarbell et al. 2007).

Vor dem Hintergrund dieses aktuellen Forschungsstands könnte sich die Fortführung der vorgestellten Arbeit auf Grundlage bisher gewonnener Fab-*Streptamer* Daten als vielversprechend erweisen. Die Etablierung neuer Maus-Modelle wie RIP-mOVA sowie der Fortführung von Experimenten zu GvHD könnten helfen, bisher nachgewiesene Tendenzen im Unterschied zwischen konventioneller Antikörper- und reversibler Fab-*Streptamer*-Färbung nicht nur weiter zu bestätigen, sondern zusätzlich potentielle Korrelate im Krankheitsmodell zu beobachten. Daneben würden weitere *in vitro* Funktionsanalysen ebenso wie die Etablierung der MACS Anreicherung für murine Fab-*Streptamere* in Analogie zu den humanen Reagenzien behilflich sein, das Verständnis dieser neuen Methode zu vertiefen.

Die erfolgreiche Generierung muriner antiCD4- und antiCD25-*Streptamer* Reagenzien und erste vielversprechende Ergebnisse ihrer Anwendung haben es möglich gemacht, diese Technologie und ihre potentiellen Vorteile *in vivo* zu beleuchten. Vielleicht können sie in Zukunft dazu beitragen einige der genannten Fragen zu beantworten um die Idee einer reversiblen Färbung von Tregs ihrer klinischen Anwendung und somit dem Patienten näher zu bringen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Wie entscheidend eine genaue Regulation des Immunsystems für die Gesundheit des Menschen ist, wird deutlich, wenn diese Kontrolle verloren geht und sich Antworten des Immunsystems gegen den eigenen Körper richten. Die Eindämmung solch fehlgeleiteter Immunantworten obliegt primär der kleinen Population  $CD4^+ CD25^+$  regulatorischer T-Zellen (Tregs) – insbesondere charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3. Ihre zentrale Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz und Homöostase gilt als gesichert, die suppressiven Mechanismen dahinter bleiben indessen Gegenstand aktueller Forschung. Ihre Fähigkeit zur Kontrolle pathologischer Immunphänomene hat Tregs in den Fokus klinischer Forschung gerückt und geholfen, ein breites Spektrum zelltherapeutischer Ansätze mit ebenso verschiedenen technischen Umsetzungen zu etablieren. So reichen die Bemühungen von *in vivo* Aktivierung über die Etablierung von iTregs bis hin zur Nutzung *ex vivo* kultivierter Zellen. Vielversprechend scheint insbesondere der Ansatz eines direkten adoptiven Transfers frisch isolierter nTregs mit dessen Hilfe bei der Behandlung von GvHD, CEDs und Diabetes mellitus Typ1 aktuell die größten Fortschritte erwartet werden. Ebenso groß scheinen jedoch die nach wie vor zahlreichen Hindernisse: Geringe Zellzahlen, unzureichende Fortschritte bei Isolierung und Reinheit der Proben sowie ein Mangel unikalere Oberflächenmarker für Tregs stellen die technischen Hauptprobleme dar. Gleichzeitig fehlt es immer noch an Wissen um die tatsächlichen Suppressionsmechanismen und das *in vivo* Verhalten transferierter Tregs. Zu guter letzt bleibt offen inwieweit bisherige Zellisolierungen mittels Antikörper oder paramagnetischer *beads* nicht nur regularische Hürden bei Transfer in den Patienten mit sich bringen, sondern auch die Zellen selbst beeinflussen. So sind durch das Beladen wichtiger Oberflächenstrukturen mit solchen Fremdkörpern Funktionseinbußen und Beeinträchtigungen in der Lebensdauer der Zellen durch blockierte, aktivierte oder internalisierte Oberflächenmoleküle wahrscheinlich.

Eine Alternative bietet hier die Technologie der reversiblen Färbung mittels Fab-*Streptameren*. Im Vergleich zu konventioneller Anreicherung und Isolierung von Tregs verbindet sie die Vorteile positiver mit denen serieller Anreicherungen und könnte somit zahlreiche der geschilderten Hindernisse umgehen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip dieser reversiblen Zellmarkierung auf die Treg-typischen Oberflächenantigene CD4 und CD25 angewendet, um erstmals murine reversible Reagenzien zu generieren.

Die vorgestellten Daten zeigen, ausgehend von der RNA der Hybridom-Zelllinien PC61 und GK1.5, wie mit Hilfe von Amplifikationsläufen und Fusionsklonierungen die ersten beiden murinen Fab-One-*STrEP Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteine gegen CD4 und CD25 hergestellt werden konnten. Die Etablierung von Testfärbungen, die Durchführung von Affinitätsmodifikationen auf Sequenzebene, sowie Experimente zu Ablösbarkeit und Reversibilität verdeutlichten eine zuverlässige Funktionsweise und gute

Färbereigenschaften der murinen Fabs. Zusammen mit der Möglichkeit zu multiplen *Streptamer*-Färbungen, die nach Optimierung reproduzierbare Ergebnisse lieferten, wurden durchflusszytometrische Zellsortierungen nach Fab-*Streptamer*-Doppelfärbung durchgeführt. Durch Überprüfung der Foxp3 Expression in isolierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Populationen konnte schließlich die hohe Färbespezifität der murinen Fab-*Streptamere* nachgewiesen werden. Somit wurde ein neues Färbereagenz zur Detektion und Isolierung muriner regulatorischer T-Zellen generiert, welches in seinen Eigenschaften mit konventionellen Antikörperfärbungen vergleichbar bleibt und diese in Reinheit und Spezifität zum Teil übertrifft.

Um die postulierten Vorteile bezüglich Funktion und Vitalität reversibel isolierter Tregs zu untersuchen, wurden vergleichende *in vitro* und *in vivo* Experimente durchgeführt. Diese umfassten *Suppression Assays* und die IL-2 abhängige Proliferation von Tregs *in vitro* sowie einfache adoptive Transfer-Versuche und Proliferationsexperimente im DEREK Mausmodell. *In vitro* zeigten reversibel gefärbte Tregs mit Antikörper-Kontrollen vergleichbare bis tendenziell erhöhte suppressive und proliferative Eigenschaften. *In vivo* führten Fab-*Streptamere* zu keinerlei funktioneller Beeinträchtigung der transferierten Zellen. So waren mit ihnen Isolierung, Transfer und Beobachtung der Tregs *in vivo* ebenso möglich wie mit konventioneller Antikörperfärbung. Statistische Aussagen zu funktionellen Vorteilen der Fab-*Streptamere* konnten jedoch aufgrund ungeeigneter Mausmodelle noch nicht gemacht werden. Gleichwohl liefern die bisher gewonnener Fab-*Streptamer* Daten eine essentielle Grundlage für weitere klinisch relevante *in vivo* Untersuchungen. So könnte die Etablierung neuer Maus-Modelle wie z.B. RIP-mOVA für Diabetes mellitus Typ1 und auch die Fortführung erster Experimente zu GvHD helfen, bisher nachgewiesene Tendenzen im Unterschied zwischen konventioneller Antikörper- und reversibler Fab-*Streptamer*-Färbung nicht nur weiter zu bestätigen, sondern zusätzlich potentielle Korrelate im Krankheitsmodell zu beobachten.

Zusammenfassend soll das Projekt als experimenteller Ansatz der Grundlagenforschung verstanden werden, der parallel zu *in vitro* Tests mit humanen reversiblen CD4- und CD25-Fab *Streptameren* durchgeführt wurde. Im Mausmodell konnten damit erste *in vivo* Ergebnisse dieser neuen Färbe- und Anreicherungs-methode gewonnen werden, die Wege zu einer künftigen Anwendbarkeit in murinen Krankheitsmodellen aufzeigen. So könnte die Idee der reversiblen Färbung in Zukunft dazu beitragen, einige der zahlreichen noch bestehenden Hindernisse in der Zelltherapie zu überwinden, um Tregs einem Einsatz in der Klinik und somit dem Patienten näher zu bringen.

## SUMMARY

A fine regulation of the immune system is essential for our health. This becomes evident, when regulation fails and the system turns against oneself. The containment of such misguided immune response rests on the tiny population of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) – particularly characterized by the expression of transcription factor Foxp3. While it is their key role to establish and maintain immunologic tolerance and homeostasis, the exact mechanisms of suppression are still object of current research. Their ability to control pathologic immunity however brought Tregs into the spotlight of clinical research and helped establishing a broad spectrum of cell therapeutic approaches with as many technical implementations. These reach from *in vivo* activation to iTregs and even the use of *ex vivo* cultivation. Especially the direct approach with adoptive transfer of freshly isolated nTregs seems to be most promising, showing current progress in the treatment of GvHD, IBDs and Type I DM. Yet, there still is an abundance of obstacles: low numbers of cells, insufficient progress with isolation and purity and a lack of specific surface markers illustrate the main problems. At the same time there is still not enough knowledge about the actual mechanisms of suppression and the *in vivo* behavior of transferred Tregs. Last but not least it remains open to what extent cell sorting by antibody staining or paramagnetic beads not only creates regulatory hurdles concerning the treatment of patients but also affects the cells themselves. Thus it is likely, that loading essential surface markers with staining reagents will lead to impaired functionality and viability of the cells by blocking, activating or internalizing surface molecules. Here the reversible staining technology with Fab-*Streptamers* provides an alternative. Compared to conventional enrichment and isolation of Tregs it combines the advantages of positive and serial enrichment and by that could just circumvent many of the problems described. In this thesis, the principle of reversible staining was adopted to target the common Treg markers CD4 and CD25 and for the first time generate reversible staining reagents for murine cells.

The data presented show how the first two murine Fab-One-STrEP *Strep-tag*<sup>®</sup> fusion proteins for CD4 and CD25 were manufactured, starting from RNA of hybridoma lines PC61 and GK1, using PCR amplification and fusion cloning. The development of staining trials and affinity modification at sequence level as well as experiments on reversibility showed reliable functionality and good staining qualities of the murine Fabs. Together with the possibility for multiple *Streptamer* staining, which after refinement produced repeatable results, flow cytometric cell sorts were performed successfully with Fab-*Streptamer* double staining. Finally, by looking at Foxp3 expression in sorted CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> populations, the high staining specificity of murine Fab-*Streptamers* could be demonstrated. Thus, a new staining reagent for detection and isolation of murine Tregs was established, which in his qualities was fully comparable to conventional antibody staining, partly exceeding the latter in purity and specificity.

To investigate the postulated advantages regarding functionality and viability of reversibly sorted Tregs, comparing experiments *in vitro* and *in vivo* were carried out. These included suppression assays and IL-2 dependent proliferation of Tregs *in vitro* as well as simple adoptive transfer trials and proliferation experiments in DREG mice. *In vitro*, reversibly stained Tregs showed a comparable or by tendency more distinct suppressive and proliferative behavior when matched against antibody control. *In vivo* Fab-*Streptamers* did not result in functional impairment of the transferred cells. Sorting, transfer and monitoring of the Tregs *in vivo* was as feasible as using conventional antibody staining. By this time, statistically resilient conclusions about functional advantages of Fab-*Streptamers* cannot be made though, due to inadequate mouse models. Nonetheless, the so far obtained Fab-*Streptamer* data provide an essential basis to further clinically relevant *in vivo* experiments. The establishment of new mouse models e.g. RIP-mOVA for Typ I DM and the resumption of initial GvHD experiments could help to not only confirm the so far observed tendencies in the comparison between conventional and reversible staining, but also investigate potential correlations in a disease model.

In summary, this project is considered as a basic research approach, concurrently conducted with *in vitro* testing of reversible anti-human CD4- and CD25-Fab *Streptamers*. Hence, first *in vivo* results from mouse models could be obtained with this new staining and enrichment technique, revealing future applications in murine disease models. Thus the idea of reversible staining could contribute to overcome many of the still existing obstacles in cell therapy and one day bring Tregs close to clinical application and by this to the patient.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Albrecht, J. 2009. "Der Einfluss Der MHC-Kompatibilität Auf Die Suppressiv Aktivität Natürlicher CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatorischer T-Zellen."
- Altman, J D, P A Moss, P J Goulder, D H Barouch, M G McHeyzer-Williams, J I Bell, A J McMichael, and M M Davis. 1996. "Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes.." *Science* 274 (5284): 94–96.
- Annacker, Oliver, Ricardo Pimenta-Araujo, Odile Burlen-Defranoux, Theolis C Barbosa, Ana Cumano, and Antonio Bandeira. 2001. "CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-10." *The Journal of Immunology* 166 (5). WEAVERLY PRESS INC: 3008–18.
- Antes, Bernhard, Philipp Oberkleiner, Andreas Nechansky, and Oliver H J Szolar. 2010. "Qualification of a Microfluidics-Based Electrophoretic Method for Impurity Testing of Monoclonal Antibodies." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (3): 743–49. doi:10.1016/j.jpba.2009.09.022.
- Apostolou, Irina, and Harald von Boehmer. 2004. "In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells.." *Journal of Experimental Medicine* 199 (10). Rockefeller Univ Press: 1401–8. doi:10.1084/jem.20040249.
- Asano, M, M Toda, N Sakaguchi, and S Sakaguchi. 1996. "Autoimmune Disease as a Consequence of Developmental Abnormality of a T Cell Subpopulation.." *Journal of Experimental Medicine* 184 (2): 387–96.
- Attarwala, H. 2010. "TGN1412: From Discovery to Disaster." *Journal of Young Pharmacists* 2 (3): 332–36. doi:10.4103/0975-1483.66810.
- Baecher-Allan, Clare, Vissia Viglietta, and David A Hafler. 2002. "Inhibition of Human CD4(+)CD25(High) Regulatory T Cell Function.." *The Journal of Immunology* 169 (11): 6210–17.
- Bardel, Emilie, Frédérique Larousserie, Pascaline Charlot-Rabiega, Aurore Coulomb-L'Herminé, and Odile Devergne. 2008. "Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Do Not Constitutively Express IL-35.." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10): 6898–6905.
- Battaglia, Manuela, Angela Stabilini, and Maria-Grazia Roncarolo. 2005. "Rapamycin Selectively Expands CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells.." *Blood* 105 (12): 4743–48. doi:10.1182/blood-2004-10-3932.
- Bes, C. 2003. "Mapping the Paratope of Anti-CD4 Recombinant Fab 13B8.2 by Combining Parallel Peptide Synthesis and Site-Directed Mutagenesis." *Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 14265–73. doi:10.1074/jbc.M210694200.
- Bettelli, Estelle, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B Strom, Mohamed Oukka, Howard L Weiner, and Vijay K Kuchroo. 2006. "Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells.." *Nature* 441 (7090). Nature Publishing

Group: 235–38. doi:10.1038/nature04753.

- Billiard, Fabienne, Elena Litvinova, David Saadoun, Fathia Djelti, David Klatzmann, José L Cohen, Gilles Marodon, and Benoît L Salomon. 2006. “Regulatory and Effector T Cell Activation Levels Are Prime Determinants of in Vivo Immune Regulation..” *The Journal of Immunology* 177 (4): 2167–74.
- Borsellino, Giovanna, Markus Kleinewietfeld, Diletta Di Mitri, Alexander Sternjak, Adamo Diamantini, Raffaella Giometto, Sabine Höpner, et al. 2007. “Expression of Ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg Cells: Hydrolysis of Extracellular ATP and Immune Suppression..” *Blood* 110 (4): 1225–32. doi:10.1182/blood-2006-12-064527.
- Broen, Jasper C A, Ingrid L M Wolvers-Tettero, Lenny Geurts-van Bon, Madelon C Vonk, Marieke J H Coenen, Robert Lafyatis, Timothy R D J Radstake, and Anton W Langerak. 2010. “Skewed X Chromosomal Inactivation Impacts T Regulatory Cell Function in Systemic Sclerosis..” *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (12). BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism: 2213–16. doi:10.1136/ard.2010.129999.
- Brunkow, M E, E W Jeffery, K A Hjerrild, B Paepers, L B Clark, S A Yasayko, J E Wilkinson, D Galas, S F Ziegler, and F Ramsdell. 2001. “Disruption of a New Forkhead/Winged-Helix Protein, Scurfin, Results in the Fatal Lymphoproliferative Disorder of the Scurfy Mouse..” *Nature Genetics* 27 (1): 68–73. doi:10.1038/83784.
- Brunstein, Claudio G, Jeffrey S Miller, Qing Cao, David H McKenna, Keli L Hippen, Julie Curtsinger, Todd Defor, et al. 2011. “Infusion of Ex Vivo Expanded T Regulatory Cells in Adults Transplanted with Umbilical Cord Blood: Safety Profile and Detection Kinetics..” *Blood* 117 (3): 1061–70. doi:10.1182/blood-2010-07-293795.
- Busch, D H, I M Pilip, S Vijh, and E G Pamer. 1998. “Coordinate Regulation of Complex T Cell Populations Responding to Bacterial Infection..” *Immunity* 8 (3): 353–62.
- Chatenoud, L, E Thervet, J Primo, and J F Bach. 1994. “Anti-CD3 Antibody Induces Long-Term Remission of Overt Autoimmunity in Nonobese Diabetic Mice..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1). National Academy of Sciences: 123–27.
- Chatenoud, Lucienne. 2003. “CD3-Specific Antibody-Induced Active Tolerance: From Bench to Bedside..” *Nature Reviews. Immunology* 3 (2): 123–32. doi:10.1038/nri1000.
- Chen, Mei-Ling, Mikaël J Pittet, Leonid Gorelik, Richard A Flavell, Ralph Weissleder, Harald von Boehmer, and Khashayarsha Khazaie. 2005. “Regulatory T Cells Suppress Tumor-Specific CD8 T Cell Cytotoxicity Through TGF-Beta Signals in Vivo..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2). National Acad Sciences: 419–24. doi:10.1073/pnas.0408197102.
- Chen, Wanjun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-Jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, and Sharon M Wahl. 2003. “Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-Beta Induction of Transcription Factor Foxp3..” *Journal of Experimental Medicine* 198 (12). Rockefeller Univ Press: 1875–86. doi:10.1084/jem.20030152.
- Chen, Xin, and Joost J Oppenheim. 2011. “Resolving the Identity Myth: Key Markers of Functional CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells.” *International Immunopharmacology* 11 (10): 1489–96. doi:10.1016/j.intimp.2011.05.018.
- Cheng, G, A Yu, M J Dee, and T R Malek. 2013. “IL-2R Signaling Is Essential for Functional



- Maturation of Regulatory T Cells During Thymic Development.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (4): 1567–75. doi:10.4049/jimmunol.1201218.
- Cho, B K, V P Rao, Q Ge, H N Eisen, and J Chen. 2000. “Homeostasis-Stimulated Proliferation Drives Naive T Cells to Differentiate Directly Into Memory T Cells..” *Journal of Experimental Medicine* 192 (4). The Rockefeller University Press: 549–56.
- Cobbold, Stephen P, Raquel Castejon, Elizabeth Adams, Diana Zelenika, Luis Graca, Susan Humm, and Herman Waldmann. 2004. “Induction of foxP3+ Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants..” *The Journal of Immunology* 172 (10): 6003–10.
- Cohen, José L, Aurélie Trenado, Douglas Vasey, David Klatzmann, and Benoît L Salomon. 2002. “CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease..” *Journal of Experimental Medicine* 196 (3). The Rockefeller University Press: 401–6. doi:10.1084/jem.20020090.
- Collison, Lauren W, Creg J Workman, Timothy T Kuo, Kelli Boyd, Yao Wang, Kate M Vignali, Richard Cross, David Sehy, Richard S Blumberg, and Dario A A Vignali. 2007. “The Inhibitory Cytokine IL-35 Contributes to Regulatory T-Cell Function..” *Nature* 450 (7169). Nature Publishing Group: 566–69. doi:10.1038/nature06306.
- Cosmi, Lorenzo, Francesco Liotta, Elena Lazzeri, Michela Francalanci, Roberta Angeli, Benedetta Mazinghi, Veronica Santarlasci, et al. 2003. “Human CD8+CD25+ Thymocytes Share Phenotypic and Functional Features with CD4+CD25+ Regulatory Thymocytes..” *Blood* 102 (12): 4107–14. doi:10.1182/blood-2003-04-1320.
- Deaglio, Silvia, Karen M Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang-Fan Chen, et al. 2007. “Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression..” *Journal of Experimental Medicine* 204 (6). Rockefeller Univ Press: 1257–65. doi:10.1084/jem.20062512.
- Di Ianni, Mauro, Franca Falzetti, Alessandra Carotti, Adelmo Terenzi, Flora Castellino, Elisabetta Bonifacio, Beatrice Del Papa, et al. 2011. “Tregs Prevent GVHD and Promote Immune Reconstitution in HLA-Haploidentical Transplantation..” *Blood* 117 (14): 3921–28. doi:10.1182/blood-2010-10-311894.
- Dieckmann, D, H Plottner, S Berchtold, T Berger, and G Schuler. 2001. “Ex Vivo Isolation and Characterization of CD4(+)CD25(+) T Cells with Regulatory Properties From Human Blood..” *Journal of Experimental Medicine* 193 (11). The Rockefeller University Press: 1303–10.
- DiPaolo, Richard J, Carine Brinster, Todd S Davidson, John Andersson, Deborah Glass, and Ethan M Shevach. 2007. “Autoantigen-Specific TGFbeta-Induced Foxp3+ Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells From Activating Autoreactive T Cells..” *The Journal of Immunology* 179 (7): 4685–93.
- DiPaolo, Richard J, Deborah D Glass, Karen E Bijwaard, and Ethan M Shevach. 2005. “CD4+CD25+ T Cells Prevent the Development of Organ-Specific Autoimmune Disease by Inhibiting the Differentiation of Autoreactive Effector T Cells..” *The Journal of Immunology* 175 (11): 7135–42.
- Durant, L R, S Makris, C M Voorburg, J Loebbermann, C Johansson, and P J M Openshaw. 2013. “Regulatory T Cells Prevent Th2 Immune Responses and Pulmonary Eosinophilia During Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice.” *Journal of Virology* 87 (20): 10946–54. doi:10.1128/JVI.01295-13.

- Edinger, Matthias, and Petra Hoffmann. 2011. "Regulatory T Cells in Stem Cell Transplantation: Strategies and First Clinical Experiences." *Current Opinion in Immunology* 23 (5). Elsevier Ltd: 679–84. doi:10.1016/j.coi.2011.06.006.
- Eisen, H N, and E B Reilly. 1985. "Lambda Chains and Genes in Inbred Mice.." *Annual Review of Immunology* 3: 337–65. doi:10.1146/annurev.iy.03.040185.002005.
- Fantini, Massimo C, Christoph Becker, Giovanni Monteleone, Francesco Pallone, Peter R Galle, and Markus F Neurath. 2004. "Cutting Edge: TGF-Beta Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25- T Cells Through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7.." *The Journal of Immunology* 172 (9): 5149–53.
- Fischer, Karin, Simon Voelkl, Jana Heymann, Grzegorz K Przybylski, Krishna Mondal, Monika Laumer, Leoni Kunz-Schughart, Christian A Schmidt, Reinhard Andreesen, and Andreas Mackensen. 2005. "Isolation and Characterization of Human Antigen-Specific TCR Alpha Beta+ CD4(-)CD8- Double-Negative Regulatory T Cells.." *Blood* 105 (7): 2828–35. doi:10.1182/blood-2004-07-2583.
- Fisson, Sylvain, Guillaume Darrasse-Jèze, Elena Litvinova, Franck Septier, David Klatzmann, Roland Liblau, and Benoît L Salomon. 2003. "Continuous Activation of Autoreactive CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in the Steady State.." *Journal of Experimental Medicine* 198 (5). Rockefeller Univ Press: 737–46. doi:10.1084/jem.20030686.
- Floess, Stefan, Jennifer Freyer, Christiane Siewert, Udo Baron, Sven Olek, Julia Polansky, Kerstin Schlawe, et al. 2007. "Epigenetic Control of the Foxp3 Locus in Regulatory T Cells.." *PLoS Biology* 5 (2). Public Library of Science: e38. doi:10.1371/journal.pbio.0050038.
- Fontenot, Jason D, Marc A Gavin, and Alexander Y Rudensky. 2003. "Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *Nature Immunology* 4 (4): 330–36. doi:10.1038/ni904.
- Gambineri, Eleonora, Lucia Perroni, Laura Passerini, Lucia Bianchi, Claudio Doglioni, Franco Meschi, Riccardo Bonfanti, et al. 2008. "Clinical and Molecular Profile of a New Series of Patients with Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: Inconsistent Correlation Between Forkhead Box Protein 3 Expression and Disease Severity.." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122 (6): 1105–1112.e1. doi:10.1016/j.jaci.2008.09.027.
- Garín, Marina I, Chung-Ching Chu, Dela Golshayan, Eva Cernuda-Morollón, Robin Wait, and Robert I Lechler. 2007. "Galectin-1: a Key Effector of Regulation Mediated by CD4+CD25+ T Cells.." *Blood* 109 (5): 2058–65. doi:10.1182/blood-2006-04-016451.
- Gavin, Marc A, Sally R Clarke, Ella Negrou, Alena Gallegos, and Alexander Rudensky. 2001. "Homeostasis and Anergy of CD4+CD25+ Suppressor T Cells in Vivo." *Nature Immunology* 3 (1): 33–41. doi:10.1038/ni743.
- Gavin, Marc A, Troy R Torgerson, Evan Houston, Paul DeRoos, William Y Ho, Asbjørg Stray-Pedersen, Elizabeth L Ocheltree, Philip D Greenberg, Hans D Ochs, and Alexander Y Rudensky. 2006. "Single-Cell Analysis of Normal and FOXP3-Mutant Human T Cells: FOXP3 Expression Without Regulatory T Cell Development.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17). National Acad Sciences: 6659–64. doi:10.1073/pnas.0509484103.
- Ge, Q, V P Rao, B K Cho, H N Eisen, and J Chen. 2001. "Dependence of Lymphopenia-Induced T Cell Proliferation on the Abundance of Peptide/ MHC Epitopes and Strength of Their Interaction

- with T Cell Receptors.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4). National Acad Sciences: 1728–33. doi:10.1073/pnas.98.4.1728.
- Gershon, R K, and K Kondo. 1970. "Cell Interactions in the Induction of Tolerance: the Role of Thymic Lymphocytes.." *Immunology* 18 (5). Wiley-Blackwell: 723–37.
- Gilliland, L K, N A Norris, H Marquardt, T T Tsu, M S Hayden, M G Neubauer, D E Yelton, R S Mittler, and J A Ledbetter. 1996. "Rapid and Reliable Cloning of Antibody Variable Regions and Generation of Recombinant Single Chain Antibody Fragments.." *Tissue Antigens* 47 (1): 1–20.
- Gondek, David C, Li-Fan Lu, Sergio A Quezada, Shimon Sakaguchi, and Randolph J Noelle. 2005. "Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism.." *The Journal of Immunology* 174 (4): 1783–86.
- Goodnow, C C, J G Cyster, S B Hartley, S E Bell, M P Cooke, J I Healy, S Akkaraju, J C Rathmell, S L Pogue, and K P Shokat. 1995. "Self-Tolerance Checkpoints in B Lymphocyte Development.." *Advances in Immunology* 59: 279–368.
- Gottenberg, Jacques-Eric, Frédéric Lavie, Karim Abbed, Jacques Gasnault, Emilie Le Nevot, Jean-François Delfraissy, Yassine Taoufik, and Xavier Mariette. 2005. "CD4 CD25high Regulatory T Cells Are Not Impaired in Patients with Primary Sjögren's Syndrome.." *Journal of Autoimmunity* 24 (3): 235–42. doi:10.1016/j.jaut.2005.01.015.
- Grohmann, Ursula, Ciriana Orabona, Francesca Fallarino, Carmine Vacca, Filippo Calcinaro, Alberto Falorni, Paola Candeloro, et al. 2002. "CTLA-4-Ig Regulates Tryptophan Catabolism in Vivo.." *Nature Immunology* 3 (11). Nature Publishing Group: 1097–1101. doi:10.1038/ni846.
- Grossman, William J, James W Verbsky, Winfried Barchet, Marco Colonna, John P Atkinson, and Timothy J Ley. 2004. "Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death.." *Immunity* 21 (4): 589–601. doi:10.1016/j.immuni.2004.09.002.
- Hahn, Bebra H, Ram Pyare Singh, Antonio La Cava, and Fanny M Ebling. 2005. "Tolerogenic Treatment of Lupus Mice with Consensus Peptide Induces Foxp3-Expressing, Apoptosis-Resistant, TGFbeta-Secreting CD8+ T Cell Suppressors.." *The Journal of Immunology* 175 (11): 7728–37.
- Hall, B M, N W Pearce, K E Gurley, and S E Dorsch. 1990. "Specific Unresponsiveness in Rats with Prolonged Cardiac Allograft Survival After Treatment with Cyclosporine. III. Further Characterization of the CD4+ Suppressor Cell and Its Mechanisms of Action.." *Journal of Experimental Medicine* 171 (1). The Rockefeller University Press: 141–57. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.059.
- Herold, Kevan C, William Hagopian, Julie A Auger, Ena Poumian-Ruiz, Lesley Taylor, David Donaldson, Stephen E Gitelman, et al. 2002. "Anti-CD3 Monoclonal Antibody in New-Onset Type 1 Diabetes Mellitus.." *The New England Journal of Medicine* 346 (22): 1692–98. doi:10.1056/NEJMoa012864.
- Hilchey, Shannon P, and Steven H Bernstein. 2007. "Use of CFSE to Monitor Ex Vivo Regulatory T-Cell Suppression of CD4 +and CD8 +T-Cell Proliferation Within Unseparated Mononuclear Cells From Malignant and Non-Malignant Human Lymph Node Biopsies.." *Immunological Investigations* 36 (5-6): 629–48. doi:10.1080/08820130701674463.
- Himmel, Megan E, Yu Yao, Paul C Orban, Theodore S Steiner, and Megan K Levings. 2012.

- “Regulatory T-Cell Therapy for Inflammatory Bowel Disease: More Questions Than Answers.” *Immunology* 136 (2): 115–22. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03572.x.
- Hiramatsu, H. 2003. “Complete Reconstitution of Human Lymphocytes From Cord Blood CD34+ Cells Using the NOD/SCID/ Cnull Mice Model.” *Blood* 102 (3): 873–80. doi:10.1182/blood-2002-09-2755.
- Hoffmann, Petra, Joerg Ermann, Matthias Edinger, C Garrison Fathman, and Samuel Strober. 2002. “Donor-Type CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation..” *Journal of Experimental Medicine* 196 (3): 389–99.
- Hoffmann, Petra, Ruediger Eder, Tina J Boeld, Kristina Doser, Biserka Piseshka, Reinhard Andreesen, and Matthias Edinger. 2006. “Only the CD45RA+ Subpopulation of CD4+CD25high T Cells Gives Rise to Homogeneous Regulatory T-Cell Lines Upon in Vitro Expansion..” *Blood* 108 (13): 4260–67. doi:10.1182/blood-2006-06-027409.
- Hoffmann, Petra, Tina J Boeld, Ruediger Eder, Jochen Huehn, Stefan Floess, Georg Wieczorek, Sven Olek, Wolfgang Dietmaier, Reinhard Andreesen, and Matthias Edinger. 2009. “Loss of FOXP3 Expression in Natural Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells Upon Repetitive in Vitro Stimulation..” *European Journal of Immunology* 39 (4): 1088–97. doi:10.1002/eji.200838904.
- Hori, S. 2003. “Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3.” *Science* 299 (5609): 1057–61. doi:10.1126/science.1079490.
- Hsieh, Chyi-Song, Ye Zheng, Yuqiong Liang, Jason D Fontenot, and Alexander Y Rudensky. 2006. “An Intersection Between the Self-Reactive Regulatory and Nonregulatory T Cell Receptor Repertoires..” *Nature Immunology* 7 (4). Nature Publishing Group: 401–10. doi:10.1038/ni1318.
- Iellem, A, M Mariani, R Lang, H Recalde, P Panina-Bordignon, F Sinigaglia, and D D'Ambrosio. 2001. “Unique Chemotactic Response Profile and Specific Expression of Chemokine Receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells..” *Journal of Experimental Medicine* 194 (6). The Rockefeller University Press: 847–53.
- Itoh, M, T Takahashi, N Sakaguchi, Y Kuniyasu, J Shimizu, F Otsuka, and S Sakaguchi. 1999. “Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance..” *The Journal of Immunology* 162 (9): 5317–26.
- Jiang, H, and L Chess. 2000. “The Specific Regulation of Immune Responses by CD8+ T Cells Restricted by the MHC Class Ib Molecule, Qa-1..” *Annual Review of Immunology* 18 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 185–216. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.185.
- Joly, Etienne, and Denis Hudrisier. 2003. “What Is Trogocytosis and What Is Its Purpose?.” *Nature Immunology* 4 (9). Nature Publishing Group: 815–15. doi:10.1038/ni0903-815.
- Jordan, M S, A Boesteanu, A J Reed, A L Petrone, A E Hohenbeck, M A Lerman, A Naji, and A J Caton. 2001. “Thymic Selection of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Induced by an Agonist Self-Peptide..” *Nature Immunology* 2 (4): 301–6. doi:10.1038/86302.
- Kappler, J W, N Roehm, and P Marrack. 1987. “T Cell Tolerance by Clonal Elimination in the Thymus..” *Cell* 49 (2): 273–80.

- Kasprowicz, Deborah J, Nathalie Droin, David M Soper, Fred Ramsdell, Douglas R Green, and Steven F Ziegler. 2005. "Dynamic Regulation of FoxP3 Expression Controls the Balance Between CD4+ T Cell Activation and Cell Death.." *European Journal of Immunology* 35 (12). WILEY-VCH Verlag: 3424–32. doi:10.1002/eji.200526339.
- Keymeulen, Bart, Evy Vandemeulebroucke, Anette G Ziegler, Chantal Mathieu, Leonard Kaufman, Geoff Hale, Frans Gorus, et al. 2005. "Insulin Needs After CD3-Antibody Therapy in New-Onset Type 1 Diabetes.." *The New England Journal of Medicine* 352 (25): 2598–2608. doi:10.1056/NEJMoa043980.
- Kim, Jeong M, Jeffrey P Rasmussen, and Alexander Y Rudensky. 2006. "Regulatory T Cells Prevent Catastrophic Autoimmunity Throughout the Lifespan of Mice." *Nature Immunology* 8 (2): 191–97. doi:10.1038/ni1428.
- Kisielow, P, H Blüthmann, U D Staerz, M Steinmetz, and H von Boehmer. 1988. "Tolerance in T-Cell-Receptor Transgenic Mice Involves Deletion of Nonmature CD4+8+ Thymocytes.." *Nature* 333 (6175). Nature Publishing Group: 742–46. doi:10.1038/333742a0.
- Kitazawa, Yusuke, Masayuki Fujino, Quanxing Wang, Hiromitsu Kimura, Miyuki Azuma, Masato Kubo, Ryo Abe, and Xiao-Kang Li. 2007. "Involvement of the Programmed Death-1/Programmed Death-1 Ligand Pathway in CD4+CD25+ Regulatory T-Cell Activity to Suppress Alloimmune Responses." *Transplantation* 83 (6): 774–82. doi:10.1097/01.tp.0000256293.90270.e8.
- Kjer-Nielsen, Lars, Michelle A Dunstone, Lyudmila Kostenko, Lauren K Ely, Travis Beddoe, Nicole A Mifsud, Anthony W Purcell, Andrew G Brooks, James McCluskey, and Jamie Rossjohn. 2004. "Crystal Structure of the Human T Cell Receptor CD3 Epsilon Gamma Heterodimer Complexed to the Therapeutic mAb OKT3.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20). National Acad Sciences: 7675–80. doi:10.1073/pnas.0402295101.
- Kleinewiefeld, Markus, Mireille Starke, Diletta Di Mitri, Giovanna Borsellino, Luca Battistini, Olaf Röttschke, and Kirsten Falk. 2009. "CD49d Provides Access to 'Untouched' Human Foxp3+ Treg Free of Contaminating Effector Cells.." *Blood* 113 (4): 827–36. doi:10.1182/blood-2008-04-150524.
- Knabel, Michael, Tobias J Franz, Matthias Schiemann, Anna Wulf, Brigitte Villmow, Burkhard Schmidt, Helga Bernhard, Hermann Wagner, and Dirk H Busch. 2002. "Reversible MHC Multimer Staining for Functional Isolation of T-Cell Populations and Effective Adoptive Transfer.." *Nature Medicine* 8 (6): 631–37. doi:10.1038/nm0602-631.
- Kohm, Adam P, Jeffrey S McMahon, Joseph R Podojil, Wendy Smith Begolka, Mathew DeGutes, Deborah J Kasprowicz, Steven F Ziegler, and Stephen D Miller. 2006. "Cutting Edge: Anti-CD25 Monoclonal Antibody Injection Results in the Functional Inactivation, Not Depletion, of CD4+CD25+ T Regulatory Cells.." *The Journal of Immunology* 176 (6): 3301–5.
- Kriegel, Martin A, Tobias Lohmann, Christoph Gabler, Norbert Blank, Joachim R Kalden, and Hanns-Martin Lorenz. 2004. "Defective Suppressor Function of Human CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Autoimmune Polyglandular Syndrome Type II.." *Journal of Experimental Medicine* 199 (9). Rockefeller Univ Press: 1285–91. doi:10.1084/jem.20032158.
- Kubach, Jan, Petra Lutter, Tobias Bopp, Sabine Stoll, Christian Becker, Eva Huter, Christoph Richter, et al. 2007. "Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells: Proteome Analysis Identifies Galectin-10 as a Novel Marker Essential for Their Anergy and Suppressive Function.." *Blood* 110 (5): 1550–58. doi:10.1182/blood-2007-01-069229.

- Kukreja, Anjali, Giulia Cost, John Marker, Chenhui Zhang, Zhong Sun, Karen Lin-Su, Svetlana Ten, et al. 2002. "Multiple Immuno-Regulatory Defects in Type-1 Diabetes.." *Journal of Clinical Investigation* 109 (1). American Society for Clinical Investigation: 131–40. doi:10.1172/JCI13605.
- Kuschel, Meike, Tanja Neumann, Peter Barthmaier, and Martin Kratzmeier. 2002. "Use of Lab-on-a-Chip Technology for Protein Sizing and Quantitation.." *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* 13 (3). The Association of Biomolecular Resource Facilities: 172–78.
- la Rosa, de, Maurus, Sascha Rutz, Heike Dorninger, and Alexander Scheffold. 2004. "Interleukin-2 Is Essential for CD4+CD25+ Regulatory T Cell Function." *European Journal of Immunology* 34 (9): 2480–88. doi:10.1002/eji.200425274.
- Lahl, Katharina, and Tim Sparwasser. 2011. "In Vivo Depletion of FoxP3+ Tregs Using the Dereg Mouse Model.." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 707: 157–72. doi:10.1007/978-1-61737-979-6\_10.
- Lehmann, Joachim, Jochen Huehn, Maurus de la Rosa, Frank Maszyra, Ute Kretschmer, Veit Krenn, Monika Brunner, Alexander Scheffold, and Alf Hamann. 2002. "Expression of the Integrin Alpha Ebeta 7 Identifies Unique Subsets of CD25+ as Well as CD25- Regulatory T Cells.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (20). National Acad Sciences: 13031–36. doi:10.1073/pnas.192162899.
- Levings, M K, R Sangregorio, and M G Roncarolo. 2001. "Human Cd25(+)Cd4(+) T Regulatory Cells Suppress Naive and Memory T Cell Proliferation and Can Be Expanded in Vitro Without Loss of Function.." *Journal of Experimental Medicine* 193 (11). The Rockefeller University Press: 1295–1302.
- Lewis, Eli C, Mark Mizrahi, Michel Toledano, Nathaniel Defelice, Joanne L Wright, Andrew Churg, Leland Shapiro, and Charles A Dinarello. 2008. "Alpha1-Antitrypsin Monotherapy Induces Immune Tolerance During Islet Allograft Transplantation in Mice.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (42). National Acad Sciences: 16236–41. doi:10.1073/pnas.0807627105.
- Li, Xiaomei, Xiangpei Li, Long Qian, Guosheng Wang, Hong Zhang, Xiaoqi Wang, Ke Chen, et al. 2007. "T Regulatory Cells Are Markedly Diminished in Diseased Salivary Glands of Patients with Primary Sjögren's Syndrome.." *The Journal of Rheumatology* 34 (12): 2438–45.
- Liang, Bitao, Craig Workman, Janine Lee, Claude Chew, Benjamin M Dale, Lucrezia Colonna, Marcella Flores, et al. 2008. "Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II.." *The Journal of Immunology* 180 (9): 5916–26.
- Lin, Wen, Dipica Haribhai, Lance M Relland, Nga Truong, Marc R Carlson, Calvin B Williams, and Talal A Chatila. 2007. "Regulatory T Cell Development in the Absence of Functional Foxp3.." *Nature Immunology* 8 (4). Nature Publishing Group: 359–68. doi:10.1038/ni1445.
- Lindley, Shelley, Colin M Dayan, Amanda Bishop, Bart O Roep, Mark Peakman, and Timothy I M Tree. 2005. "Defective Suppressor Function in CD4(+)CD25(+) T-Cells From Patients with Type 1 Diabetes.." *Diabetes* 54 (1): 92–99.
- Linker-Israeli, M, A C Bakke, R C Kitridou, S Gendler, S Gillis, and D A Horwitz. 1983. "Defective Production of Interleukin 1 and Interleukin 2 in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE).." *The Journal of Immunology* 130 (6): 2651–55.

- Liu, M-F, C-R Wang, L-L Fung, L-H Lin, and C-N Tsai. 2005. "The Presence of Cytokine-Suppressive CD4+CD25+ T Cells in the Peripheral Blood and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis.." *Scandinavian Journal of Immunology* 62 (3). Blackwell Science Ltd: 312–17. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01656.x.
- Liu, Yanying, Rong Mu, Shiyao Wang, Li Long, Xia Liu, Ru Li, Jian Sun, et al. 2010. "Therapeutic Potential of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 12 (6). BioMed Central Ltd: R210. doi:10.1186/ar3187.
- Lock, R B. 2002. "The Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient (NOD/SCID) Mouse Model of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Intrinsic Differences in Biologic Characteristics at Diagnosis and Relapse." *Blood* 99 (11): 4100–4108. doi:10.1182/blood.V99.11.4100.
- Long, S Alice, and Jane H Buckner. 2008. "Combination of Rapamycin and IL-2 Increases De Novo Induction of Human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T Cells.." *Journal of Autoimmunity* 30 (4): 293–302. doi:10.1016/j.jaut.2007.12.012.
- Maile, R, B Wang, W Schooler, A Meyer, E J Collins, and J A Frelinger. 2001. "Antigen-Specific Modulation of an Immune Response by in Vivo Administration of Soluble MHC Class I Tetramers.." *The Journal of Immunology* 167 (7): 3708–14.
- Maloy, K J, and F Powrie. 2001. "Regulatory T Cells in the Control of Immune Pathology.." *Nature Immunology* 2 (9). Nature Publishing Group: 816–22. doi:10.1038/ni0901-816.
- Mamura, Mizuko, WoonKyu Lee, Timothy J Sullivan, Angelina Felici, Anastasia L Sowers, James P Allison, and John J Letterio. 2004. "CD28 Disruption Exacerbates Inflammation in Tgf-Beta1-/- Mice: in Vivo Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells Independent of Autocrine TGF-Beta1.." *Blood* 103 (12): 4594–4601. doi:10.1182/blood-2003-08-2897.
- Meloni, Federica, Patrizio Vitulo, Alessia Marone Bianco, Enrica Paschetto, Monica Morosini, Alessandro Cascina, Iolanda Mazzucchelli, et al. 2004. "Regulatory CD4+CD25+ T Cells in the Peripheral Blood of Lung Transplant Recipients: Correlation with Transplant Outcome.." *Transplantation* 77 (5): 762–66.
- Mempel, Thorsten R, Mikael J Pittet, Khashayarsha Khazaie, Wolfgang Weninger, Ralph Weissleder, Harald von Boehmer, and Ulrich H von Andrian. 2006. "Regulatory T Cells Reversibly Suppress Cytotoxic T Cell Function Independent of Effector Differentiation.." *Immunity* 25 (1): 129–41. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.015.
- Meng, Li, Jian Ouyang, Haitao Zhang, Yanting Wen, Junhao Chen, and Jinyong Zhou. 2011. "Treatment of an Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model with Nonmyeloablative Conditioning and Syngeneic Bone Marrow Transplantation.." *Restorative Neurology and Neuroscience* 29 (3): 177–85. doi:10.3233/RNN-2011-0590.
- Mills, Kingston H G. 2004. "Regulatory T Cells: Friend or Foe in Immunity to Infection?." *Nature Reviews. Immunology* 4 (11). Nature Publishing Group: 841–55. doi:10.1038/nri1485.
- Misra, Namita, Jagadeesh Bayry, Sébastien Lacroix-Desmazes, Michel D Kazatchkine, and Srinivasa Kaveri. 2004. "Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells.." *The Journal of Immunology* 172 (8): 4676–80.
- Miyara, Makoto, Guy Gorochov, Michael Ehrenstein, Lucile Musset, Shimon Sakaguchi, and Zahir Amoura. 2011. "Human FoxP3+ Regulatory T Cells in Systemic Autoimmune Diseases."

- Autoimmunity Reviews*, June. Elsevier B.V., 1–12. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.004.
- Miyara, Makoto, Kajsia Wing, and Shimon Sakaguchi. 2009. “Therapeutic Approaches to Allergy and Autoimmunity Based on FoxP3+ Regulatory T-Cell Activation and Expansion..” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (4): 749–55–quiz756–7. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.001.
- Moore, K W, R de Waal Malefyt, R L Coffman, and A O'Garra. 2001. “Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor..” *Annual Review of Immunology* 19 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- Morelli, Adrian E, and Angus W Thomson. 2007. “Tolerogenic Dendritic Cells and the Quest for Transplant Tolerance..” *Nature Reviews. Immunology* 7 (8). Nature Publishing Group: 610–21. doi:10.1038/nri2132.
- Morgan, Mary E, Roelof Flierman, Leonie M van Duivenvoorde, Hendrik J Witteveen, Willem van Ewijk, Jacob M van Laar, René R P de Vries, and René E M Toes. 2005. “Effective Treatment of Collagen-Induced Arthritis by Adoptive Transfer of CD25+ Regulatory T Cells..” *Arthritis and Rheumatism* 52 (7): 2212–21. doi:10.1002/art.21195.
- Morgan, Matthew D, Clara J Day, Karen P Piper, Naeem Khan, Lorraine Harper, Paul A Moss, and Caroline O S Savage. 2010. “Patients with Wegener's Granulomatosis Demonstrate a Relative Deficiency and Functional Impairment of T-Regulatory Cells..” *Immunology* 130 (1). Blackwell Publishing Ltd: 64–73. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03213.x.
- Mottet, Christian, and Dela Golshayan. 2007. “CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells: From Basic Research to Potential Therapeutic Use..” *Swiss Medical Weekly* 137 (45-46): 625–34.
- Mottet, Christian, Holm H Uhlig, and Fiona Powrie. 2003. “Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells..” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (8): 3939–43.
- Möttönen, M, J Heikkinen, L Mustonen, P Isomäki, R Luukkainen, and O Lassila. 2005. “CD4+ CD25+ T Cells with the Phenotypic and Functional Characteristics of Regulatory T Cells Are Enriched in the Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis..” *Clinical and Experimental Immunology* 140 (2). Blackwell Science Ltd: 360–67. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02754.x.
- Muthukumar, Thangamani, Darshana Dadhania, Ruchuang Ding, Catherine Snopkowski, Rubina Naqvi, Jun B Lee, Choli Hartono, et al. 2005. “Messenger RNA for FOXP3 in the Urine of Renal-Allograft Recipients..” *The New England Journal of Medicine* 353 (22): 2342–51. doi:10.1056/NEJMoa051907.
- Nadali, G, E A de Wynter, and N G Testa. 1995. “CD34 Cell Separation: From Basic Research to Clinical Applications..” *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 25 (3): 121–27.
- Nagahama, Kanji, Zoltan Fehervari, Takatoku Oida, Tomoyuki Yamaguchi, Osamu Ogawa, and Shimon Sakaguchi. 2009. “Differential Control of Allo-Antigen-Specific Regulatory T Cells and Effector T Cells by Anti-CD4 and Other Agents in Establishing Transplantation Tolerance..” *International Immunology* 21 (4). Oxford University Press: 379–91. doi:10.1093/intimm/dxp005.
- Nelson, Brad H. 2004. “IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance..” *The Journal of Immunology* 172 (7): 3983–88.
- Neudorfer, Julia, Burkhard Schmidt, Katharina M Huster, Florian Anderl, Matthias Schiemann, Gerd



- Holzappel, Thomas Schmidt, et al. 2007. "Reversible HLA Multimers (Streptamers) for the Isolation of Human Cytotoxic T Lymphocytes Functionally Active Against Tumor- and Virus-Derived Antigens." *Journal of Immunological Methods* 320 (1-2): 119–31. doi:10.1016/j.jim.2007.01.001.
- Nishizuka, Y, and T Sakakura. 1969. "Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad After Neonatal Thymectomy in Mice.." *Science* 166 (3906): 753–55.
- Novak, E J, A W Liu, G T Nepom, and W W Kwok. 1999. "MHC Class II Tetramers Identify Peptide-Specific Human CD4(+) T Cells Proliferating in Response to Influenza a Antigen.." *Journal of Clinical Investigation* 104 (12). American Society for Clinical Investigation: R63–R67. doi:10.1172/JCI8476.
- O'Garra, A, and K Murphy. 1994. "Role of Cytokines in Determining T-Lymphocyte Function.." *Current Opinion in Immunology* 6 (3): 458–66.
- Onishi, Yasushi, Zoltan Fehervari, Tomoyuki Yamaguchi, and Shimon Sakaguchi. 2008. "Foxp3+ Natural Regulatory T Cells Preferentially Form Aggregates on Dendritic Cells in Vitro and Actively Inhibit Their Maturation.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29). National Acad Sciences: 10113–18. doi:10.1073/pnas.0711106105.
- Pandiyan, Pushpa, Lixin Zheng, Satoru Ishihara, Jennifer Reed, and Michael J Lenardo. 2007. "CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Induce Cytokine Deprivation-Mediated Apoptosis of Effector CD4+ T Cells.." *Nature Immunology* 8 (12). Nature Publishing Group: 1353–62. doi:10.1038/ni1536.
- Pape, K A, J J Taylor, R W Maul, P J Gearhart, and M K Jenkins. 2011. "Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune Response." *Science* 331 (6021): 1203–7. doi:10.1126/science.1201730.
- Penhale, W J, A Farmer, R P McKenna, and W J Irvine. 1973. "Spontaneous Thyroiditis in Thymectomized and Irradiated Wistar Rats.." *Clinical and Experimental Immunology* 15 (2). Wiley-Blackwell: 225–36. doi:10.4049/jimmunol.0904076.
- Penhale, W J, W J Irvine, J R Inglis, and A Farmer. 1976. "Thyroiditis in T Cell-Depleted Rats: Suppression of the Autoallergic Response by Reconstitution with Normal Lymphoid Cells.." *Clinical and Experimental Immunology* 25 (1). Wiley-Blackwell: 6–16.
- Perruche, Sylvain, Pin Zhang, Yongzhong Liu, Philippe Saas, Jeffrey A Bluestone, and Wanjun Chen. 2008. "CD3-Specific Antibody-Induced Immune Tolerance Involves Transforming Growth Factor-Beta From Phagocytes Digesting Apoptotic T Cells.." *Nature Medicine* 14 (5). Nature Publishing Group: 528–35. doi:10.1038/nm1749.
- Quezada, Sergio A, Kathy Bennett, Bruce R Blazar, Alexander Y Rudensky, Shimon Sakaguchi, and Randolph J Noelle. 2005. "Analysis of the Underlying Cellular Mechanisms of Anti-CD154-Induced Graft Tolerance: the Interplay of Clonal Anergy and Immune Regulation.." *The Journal of Immunology* 175 (2): 771–79.
- Rifa'i, Muhaimin, Yoshiyuki Kawamoto, Izumi Nakashima, and Haruhiko Suzuki. 2004. "Essential Roles of CD8+CD122+ Regulatory T Cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis.." *Journal of Experimental Medicine* 200 (9). Rockefeller Univ Press: 1123–34. doi:10.1084/jem.20040395.
- Riley, James L, Carl H June, and Bruce R Blazar. 2009. "Human T Regulatory Cell Therapy: Take a Billion or So and Call Me in the Morning." 30 (5): 656–65. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.006.

- Rimbert, Marie, Mohamed Hamidou, Cécile Braudeau, Xavier Puéchal, Luis Teixeira, Hèleène Caillon, Antoine Néel, Marie Audrain, Loic Guillevin, and Régis Josien. 2011. "Decreased Numbers of Blood Dendritic Cells and Defective Function of Regulatory T Cells in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis.." Edited by Frederic Rieux-Laucat. *PLoS ONE* 6 (4). Public Library of Science: e18734. doi:10.1371/journal.pone.0018734.
- Rintisch, Carola, Jacqueline Ameri, Peter Olofsson, Holger Luthman, and Rikard Holmdahl. 2008. "Positional Cloning of the Igl Genes Controlling Rheumatoid Factor Production and Allergic Bronchitis in Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (37). National Acad Sciences: 14005–10.
- Saadoun, David, Michelle Rosenzweig, Dan Landau, Jean Charles Piette, David Klatzmann, and Patrice Cacoub. 2008. "Restoration of Peripheral Immune Homeostasis After Rituximab in Mixed Cryoglobulinemia Vasculitis.." *Blood* 111 (11): 5334–41. doi:10.1182/blood-2007-11-122713.
- Saiki, R K, D H Gelfand, S Stoffel, S J Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, and H A Erlich. 1988. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase.." *Science* 239 (4839): 487–91.
- Sakaguchi, S, K Fukuma, K Kuribayashi, and T Masuda. 1985. "Organ-Specific Autoimmune Diseases Induced in Mice by Elimination of T Cell Subset. I. Evidence for the Active Participation of T Cells in Natural Self-Tolerance; Deficit of a T Cell Subset as a Possible Cause of Autoimmune Disease.." *Journal of Experimental Medicine* 161 (1). The Rockefeller University Press: 72–87.
- Sakaguchi, S, N Sakaguchi, M Asano, M Itoh, and M Toda. 1995. "Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases.." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (3): 1151–64.
- Sakaguchi, S, T Takahashi, and Y Nishizuka. 1982. "Study on Cellular Events in Postthymectomy Autoimmune Oophoritis in Mice. I. Requirement of Lyt-1 Effector Cells for Oocytes Damage After Adoptive Transfer.." *Journal of Experimental Medicine* 156 (6): 1565–76.
- Sakaguchi, Shimon. 2004. "Naturally Arising CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 22 (1): 531–62. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- Sakaguchi, Shimon. 2005. "Naturally Arising Foxp3-Expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Immunological Tolerance to Self and Non-Self." *Nature Immunology* 6 (4): 345–52. doi:10.1038/ni1178.
- Sakaguchi, Shimon, Kajsia Wing, and Makoto Miyara. 2007. "Regulatory T Cells - a Brief History and Perspective.." *European Journal of Immunology* 37 Suppl 1 (November): S116–23. doi:10.1002/eji.200737593.
- Sakaguchi, Shimon, Shohei Hori, Yoshinori Fukui, Takehiko Sasazuki, Noriko Sakaguchi, and Takeshi Takahashi. 2003. "Thymic Generation and Selection of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells: Implications of Their Broad Repertoire and High Self-Reactivity for the Maintenance of Immunological Self-Tolerance.." *Novartis Foundation Symposium* 252: 6–16–discussion16–23–106–14.
- Salama, Alan D, Nader Najafian, Michael R Clarkson, William E Harmon, and Mohamed H Sayegh. 2003. "Regulatory CD25<sup>+</sup> T Cells in Human Kidney

- Transplant Recipients..” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14 (6): 1643–51.
- Sanchez, P, P N Marche, C Le Guern, and P A Cazenave. 1987. “Structure of a Third Murine Immunoglobulin Lambda Light Chain Variable Region That Is Expressed in Laboratory Mice..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24): 9185–88.
- Sarigul, M, V Yazisiz, C I Bassorgun, M Ulker, A B Avci, F Erbasan, T Gelen, R M Gorczynski, and E Terzioglu. 2010. “The Numbers of Foxp3 + Treg Cells Are Positively Correlated with Higher Grade of Infiltration at the Salivary Glands in Primary Sjogren's Syndrome..” *Lupus* 19 (2). SAGE Publications: 138–45. doi:10.1177/0961203309348234.
- Sarris, Milka, Kristian G Andersen, Felix Randow, Luzia Mayr, and Alexander G Betz. 2008. “Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells During Antigen Recognition..” *Immunity* 28 (3): 402–13. doi:10.1016/j.immuni.2008.01.012.
- Sarween, Nadia, Anna Chodos, Chandra Raykundalia, Mahmood Khan, Abul K Abbas, and Lucy S K Walker. 2004. “CD4+CD25+ Cells Controlling a Pathogenic CD4 Response Inhibit Cytokine Differentiation, CXCR-3 Expression, and Tissue Invasion..” *The Journal of Immunology* 173 (5): 2942–51.
- Schmitt, Anita, Torsten Tonn, Dirk H Busch, Götz Ulrich Grigoleit, Hermann Einsele, Marcus Odendahl, Lothar Germeroth, et al. 2011. “Adoptive Transfer and Selective Reconstitution of Streptamer-Selected Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells Leads to Virus Clearance in Patients After Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation..” *Transfusion* 51 (3). Blackwell Publishing Inc: 591–99. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x.
- Schneider, Anya, Mary Rieck, Srinath Sanda, Catherine Pihoker, Carla Greenbaum, and Jane H Buckner. 2008. “The Effector T Cells of Diabetic Subjects Are Resistant to Regulation via CD4+ FOXP3+ Regulatory T Cells..” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10). NIH Public Access: 7350–55.
- Sempere-Ortells, José Miguel, Vicente Pérez-García, Gema Marín-Alberca, Alejandra Peris-Pertusa, José Miguel Benito, Francisco Manuel Marco, José Jacobo Zubcoff, and Francisco Javier Navarro-Blasco. 2009. “Quantification and Phenotype of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis According to Disease Activity Score-28..” *Autoimmunity* 42 (8). InformaLondon, UK: 636–45. doi:10.3109/08916930903061491.
- Setoguchi, R. 2005. “Homeostatic Maintenance of Natural Foxp3+ CD25+ CD4+ Regulatory T Cells by Interleukin (IL)-2 and Induction of Autoimmune Disease by IL-2 Neutralization.” *Journal of Experimental Medicine* 201 (5): 723–35. doi:10.1084/jem.20041982.
- Shalev, Itay, Hao Liu, Cheryl Koscik, Agata Bartczak, Mojib Javadi, Kit Man Wong, Asif Maknojjia, et al. 2008. “Targeted Deletion of Fgl2 Leads to Impaired Regulatory T Cell Activity and Development of Autoimmune Glomerulonephritis..” *The Journal of Immunology* 180 (1): 249–60.
- Shen, Shiqian, Yi Ding, Carlos E Tadokoro, Danyvid Olivares-Villagómez, Marlin Camps-Ramírez, Maria A Curotto de Lafaille, and Juan J Lafaille. 2005. “Control of Homeostatic Proliferation by Regulatory T Cells..” *Journal of Clinical Investigation* 115 (12). American Society for Clinical Investigation: 3517–26. doi:10.1172/JCI25463.
- Shevach, Ethan M. 2006. “From Vanilla to 28 Flavors: Multiple Varieties of T Regulatory Cells” 25 (2): 195–201. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.003.
- Shevach, Ethan M. 2009. “Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression.” 30 (5):

636–45. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.010.

- Shevach, Ethan M, Richard A DiPaolo, John Andersson, Dong-Mei Zhao, Geoffrey L Stephens, and Angela M Thornton. 2006. “The Lifestyle of Naturally Occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ Regulatory T Cells..” *Immunological Reviews* 212 (August): 60–73. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x.
- Shultz, L D, P A Schweitzer, S W Christianson, B Gott, I B Schweitzer, B Tennent, S McKenna, L Mobraaten, T V Rajan, and D L Greiner. 1995. “Multiple Defects in Innate and Adaptive Immunologic Function in NOD/LtSz-Scid Mice..” *The Journal of Immunology* 154 (1): 180–91.
- Simonetta, Federico, Nicolas Gestermann, Kim Zita Martinet, Michele Boniotto, Pierre Tissières, Benedict Seddon, and Christine Bourgeois. 2012. “Interleukin-7 Influences FOXP3+CD4+ Regulatory T Cells Peripheral Homeostasis.” Edited by Ana Claudia Zenclussen. *PLoS ONE* 7 (5): e36596. doi:10.1371/journal.pone.0036596.g005.
- Stemberger, Christian, Katharina M Huster, Martina Koffler, Florian Anderl, Matthias Schiemann, Hermann Wagner, and Dirk H Busch. 2007. “A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop Into Diverse Effector and Memory Subsets.” 27 (6): 985–97. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.012.
- Stemberger, Christian, Stefan Dreher, Claudia Tschulik, Christine Piossek, Jeannette Bet, Tori N Yamamoto, Matthias Schiemann, et al. 2012. “Novel Serial Positive Enrichment Technology Enables Clinical Multiparameter Cell Sorting..” Edited by Luzia Helena Carvalho. *PLoS ONE* 7 (4). Public Library of Science: e35798. doi:10.1371/journal.pone.0035798.
- Strauss, Laura, Theresa L Whiteside, Ashley Knights, Christoph Bergmann, Alexander Knuth, and Alfred Zippelius. 2007. “Selective Survival of Naturally Occurring Human CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Cultured with Rapamycin..” *The Journal of Immunology* 178 (1): 320–29.
- Suntharalingam, Ganesh, Meghan R Perry, Stephen Ward, Stephen J Brett, Andrew Castello-Cortes, Michael D Brunner, and Nicki Panoskaltis. 2006. “Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412..” *The New England Journal of Medicine* 355 (10): 1018–28. doi:10.1056/NEJMoa063842.
- Szanya, Veronika, Joerg Ermann, Cariel Taylor, Claire Holness, and C Garrison Fathman. 2002. “The Subpopulation of CD4+CD25+ Splenocytes That Delays Adoptive Transfer of Diabetes Expresses L-Selectin and High Levels of CCR7..” *The Journal of Immunology* 169 (5): 2461–65.
- Tadokoro, C E. 2006. “Regulatory T Cells Inhibit Stable Contacts Between CD4+ T Cells and Dendritic Cells in Vivo.” *Journal of Experimental Medicine* 203 (3): 505–11. doi:10.1084/jem.20050783.
- Takahashi, T, Y Kuniyasu, M Toda, N Sakaguchi, M Itoh, M Iwata, J Shimizu, and S Sakaguchi. 1998. “Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells: Induction of Autoimmune Disease by Breaking Their Anergic/Suppressive State..” *International Immunology* 10 (12): 1969–80.
- Tang, Qizhi, Jason Y Adams, Aaron J Tooley, Mingying Bi, Brian T Fife, Pau Serra, Pere Santamaria, Richard M Locksley, Matthew F Krummel, and Jeffrey A Bluestone. 2006. “Visualizing Regulatory T Cell Control of Autoimmune Responses in Nonobese Diabetic Mice..” *Nature Immunology* 7 (1): 83–92. doi:10.1038/ni1289.
- Tang, Qizhi, Kammi J Henriksen, Mingying Bi, Erik B Finger, Greg Szot, Jianqin Ye, Emma L

- Masteller, Hugh McDevitt, Mark Bonyhadi, and Jeffrey A Bluestone. 2004. "In Vitro-Expanded Antigen-Specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes.." *Journal of Experimental Medicine* 199 (11). Rockefeller Univ Press: 1455–65. doi:10.1084/jem.20040139.
- Tarbell, K V, L Petit, X Zuo, P Toy, X Luo, A Mqadmi, H Yang, M Suthanthiran, S Mojssov, and R M Steinman. 2007. "Dendritic Cell-Expanded, Islet-Specific CD4+ CD25+ CD62L+ Regulatory T Cells Restore Normoglycemia in Diabetic NOD Mice." *Journal of Experimental Medicine* 204 (1): 191–201. doi:10.1084/jem.20061631.
- Taylor, Patricia A, Christopher J Lees, and Bruce R Blazar. 2002. "The Infusion of Ex Vivo Activated and Expanded CD4(+)/CD25(+) Immune Regulatory Cells Inhibits Graft-Versus-Host Disease Lethality.." *Blood* 99 (10): 3493–99.
- Thornton, A M, and E M Shevach. 1998. "CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation in Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production.." *Journal of Experimental Medicine* 188 (2). The Rockefeller University Press: 287–96.
- Thornton, A M, and E M Shevach. 2000. "Suppressor Effector Function of CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific.." *The Journal of Immunology* 164 (1): 183–90.
- Thornton, Angela M, Ciriaco A Piccirillo, and Ethan M Shevach. 2004. "Activation Requirements for the Induction of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function.." *European Journal of Immunology* 34 (2). WILEY-VCH Verlag: 366–76. doi:10.1002/eji.200324455.
- Thornton, Angela M, Erin E Donovan, Ciriaco A Piccirillo, and Ethan M Shevach. 2004. "Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the in Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function.." *The Journal of Immunology* 172 (11): 6519–23.
- Tivol, E A, F Borriello, A N Schweitzer, W P Lynch, J A Bluestone, and A H Sharpe. 1995. "Loss of CTLA-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4.." *Immunity* 3 (5): 541–47.
- Tran, Dat Q, Heather Ramsey, and Ethan M Shevach. 2007. "Induction of FOXP3 Expression in Naive Human CD4+FOXP3 T Cells by T-Cell Receptor Stimulation Is Transforming Growth Factor-Beta Dependent but Does Not Confer a Regulatory Phenotype.." *Blood* 110 (8): 2983–90. doi:10.1182/blood-2007-06-094656.
- Tran, Dat Q, John Andersson, Donna Hardwick, Lolita Bebris, Gabor G Illei, and Ethan M Shevach. 2009. "Selective Expression of Latency-Associated Peptide (LAP) and IL-1 Receptor Type I/II (CD121a/CD121b) on Activated Human FOXP3+ Regulatory T Cells Allows for Their Purification From Expansion Cultures.." *Blood* 113 (21): 5125–33. doi:10.1182/blood-2009-01-199950.
- Valencia, Xavier, Cheryl Yarboro, Gabor Illei, and Peter E Lipsky. 2007. "Deficient CD4+CD25high T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus.." *The Journal of Immunology* 178 (4): 2579–88.
- Valmori, Danila, Andrea Merlo, Naira E Souleimanian, Charles S Hesdorffer, and Maha Ayyoub. 2005. "A Peripheral Circulating Compartment of Natural Naive CD4 Tregs.." *Journal of Clinical Investigation* 115 (7). American Society for Clinical Investigation: 1953–62. doi:10.1172/JCI23963.
- van Amelsfort, Joesa M R, Joel A G van Roon, Madelon Noordegraaf, Kim M G Jacobs, Johannes W J Bijlsma, Floris P J G Lafeber, and Leonie S Taams. 2007. "Proinflammatory Mediator-Induced

- Reversal of CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell-Mediated Suppression in Rheumatoid Arthritis.." *Arthritis and Rheumatism* 56 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 732–42. doi:10.1002/art.22414.
- van Amelsfort, Jocea M R, Kim M G Jacobs, Johannes W J Bijlsma, Floris P J G Laféber, and Leonie S Taams. 2004. "CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis: Differences in the Presence, Phenotype, and Function Between Peripheral Blood and Synovial Fluid.." *Arthritis and Rheumatism* 50 (9). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 2775–85. doi:10.1002/art.20499.
- Venigalla, Ram Kumar Chowdary, Theresa Tretter, Stefan Krienke, Regina Max, Volker Eckstein, Norbert Blank, Christoph Fiehn, Anthony Dick Ho, and Hanns-Martin Lorenz. 2008. "Reduced CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>-</sup> T Cell Sensitivity to the Suppressive Function of CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>high</sup>,CD127<sup>-</sup>/Low Regulatory T Cells in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus.." *Arthritis and Rheumatism* 58 (7). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 2120–30. doi:10.1002/art.23556.
- Vlad, George, Raffaello Cortesini, and Nicole Suciuc-Foca. 2005. "License to Heal: Bidirectional Interaction of Antigen-Specific Regulatory T Cells and Tolerogenic APC.." *The Journal of Immunology* 174 (10): 5907–14.
- Voss, S, and A Skerra. 1997. "Mutagenesis of a Flexible Loop in Streptavidin Leads to Higher Affinity for the Strep-Tag II Peptide and Improved Performance in Recombinant Protein Purification.." *Protein Engineering* 10 (8): 975–82.
- Walker, L S K, A Chodos, M Eggena, H Dooms, and A K Abbas. 2003. "Antigen-Dependent Proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Vivo." *Journal of Experimental Medicine* 198 (2): 249–58. doi:10.1084/jem.20030315.
- Wildin, R S, F Ramsdell, J Peake, F Faravelli, J L Casanova, N Buist, E Levy-Lahad, et al. 2001. "X-Linked Neonatal Diabetes Mellitus, Enteropathy and Endocrinopathy Syndrome Is the Human Equivalent of Mouse Scurfy.." *Nature Genetics* 27 (1): 18–20. doi:10.1038/83707.
- Wuest, T Y, J Willette-Brown, S K Durum, and A A Hurwitz. 2008. "The Influence of IL-2 Family Cytokines on Activation and Function of Naturally Occurring Regulatory T Cells." *Journal of Leukocyte Biology* 84 (4): 973–80. doi:10.1189/jlb.1107778.
- Xia, G, J He, and J R Leventhal. 2008. "Ex Vivo-Expanded Natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Synergize with Host T-Cell Depletion to Promote Long-Term Survival of Allografts.." *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (2). Blackwell Publishing Ltd: 298–306. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02088.x.
- Xia, Guliang, Jie He, Zheng Zhang, and Joseph R Leventhal. 2006. "Targeting Acute Allograft Rejection by Immunotherapy with Ex Vivo-Expanded Natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells.." *Transplantation* 82 (12): 1749–55. doi:10.1097/01.tp.0000250731.44913.ee.
- Xia, Guliang, Malathi Shah, and Xunrong Luo. 2009. "Prevention of Allograft Rejection by Amplification of Foxp3<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> Regulatory T Cells.." *Translational Research : the Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 153 (2): 60–70. doi:10.1016/j.trsl.2008.12.001.
- Xu, Junji, Dandan Wang, Dayong Liu, Zhipeng Fan, Huayong Zhang, Ousheng Liu, Gang Ding, et al. 2012. "Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Alleviates Experimental and Clinical Sjogren's Syndrome.." *Blood*, August. doi:10.1182/blood-2011-11-391144.

- Yamazaki, Sayuri, Munjal Patel, Alice Harper, Anthony Bonito, Hidehiro Fukuyama, Maggi Pack, Kristin V Tarbell, et al. 2006. "Effective Expansion of Alloantigen-Specific Foxp3+ CD25+ CD4+ Regulatory T Cells by Dendritic Cells During the Mixed Leukocyte Reaction.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8). National Acad Sciences: 2758–63. doi:10.1073/pnas.0510606103.
- Yan, Bing, Shuang Ye, Guangjie Chen, Miao Kuang, Nan Shen, and Shunle Chen. 2008. "Dysfunctional CD4+,CD25+ Regulatory T Cells in Untreated Active Systemic Lupus Erythematosus Secondary to Interferon-Alpha-Producing Antigen-Presenting Cells.." *Arthritis and Rheumatism* 58 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 801–12. doi:10.1002/art.23268.
- Yang, Hua-xia, Wen Zhang, Li-dan Zhao, Yang Li, Feng-chun Zhang, Fu-lin Tang, Wei He, and Xuan Zhang. 2009. "Are CD4+CD25-Foxp3+ Cells in Untreated New-Onset Lupus Patients Regulatory T Cells?." *Arthritis Research & Therapy* 11 (5). BioMed Central Ltd: R153. doi:10.1186/ar2829.
- Yu, Aixin, Linjian Zhu, Norman H Altman, and Thomas R Malek. 2009. "A Low Interleukin-2 Receptor Signaling Threshold Supports the Development and Homeostasis of T Regulatory Cells.." *Immunity* 30 (2): 204–17. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.014.
- Zeng, Xun, Yu-Ling Wei, Jun Huang, Evan W Newell, Hongxiang Yu, Brian A Kidd, Michael S Kuhns, et al. 2012. "T $\delta$  T Cells Recognize a Microbial Encoded B Cell Antigen to Initiate a Rapid Antigen-Specific Interleukin-17 Response" 37 (3): 524–34. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.011.
- Zhan, Y, R M Martin, R M Sutherland, J L Brady, and A M Lew. 2000. "Local Production of Anti-CD4 Antibody by Transgenic Allogeneic Grafts Affords Partial Protection.." *Transplantation* 70 (6): 947–54.
- Zheng, Ye, Steven Z Josefowicz, Arnold Kas, Tin-Tin Chu, Marc A Gavin, and Alexander Y Rudensky. 2007. "Genome-Wide Analysis of Foxp3 Target Genes in Developing and Mature Regulatory T Cells.." *Nature* 445 (7130). Nature Publishing Group: 936–40. doi:10.1038/nature05563.
- Zhou, Liang, Jared E Lopes, Mark M W Chong, Ivaylo I Ivanov, Roy Min, Gabriel D Victora, Yuele Shen, et al. 2008. "TGF-Beta-Induced Foxp3 Inhibits T(H)17 Cell Differentiation by Antagonizing ROR $\gamma$  Function.." *Nature* 453 (7192). Nature Publishing Group: 236–40. doi:10.1038/nature06878.

# DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich zu allererst bei meinem Doktorvater und Mentor Professor Dirk Busch, der mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gab und es mit weitsichtigen Ideen stets aufs Neue verstand meine Begeisterung zu wecken. Seine Unterstützung und sein großes Vertrauen mir gegenüber haben mich immer motiviert und diese Arbeit vorangetrieben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. Christian Stemberger und Dr. Stefan Dreher. Ihre Pionierarbeit auf dem Gebiet der Fab-Multimer Technologie, ihre große Geduld bei der Einführung in diese komplexe Thematik, ihre unermüdliche Hilfestellung, die zahlreichen inspirierenden Diskussionen in und außerhalb des Labors und aber vor allem ihre Freundschaft haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Natürlich möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen im Labor allen voran Inge Hensel, Anna Hochholzer, Dr. Bianca Weißbrich, Dr. Patricia Gräf, Dr. Veit Buchholz, Dr. Georg Dössinger, Dr. Florian Anderl, Dr. Herbert Stadler, Lynette Henkel und Dr. Matthias Schiemann für ihre fachliche wie menschliche Unterstützung in den letzten Jahren und die einfach gute Zeit im Labor danken.

Ein ebensolcher Dank gilt all meinen Freundinnen und Freunden abseits des Instituts, meinem Bruder und meiner wundervollen Veronika, für all die Geduld, ihr offenes Ohr und die vielen aufbauenden Worte.

Mein größter Dank jedoch gilt meinen Eltern, ohne die all dies schlichtweg nicht passiert wäre.

Marc Nikolaus