

**Untersuchung des Einflusses von extrazellulärem
Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) auf
regulatorische T Zellen der Maus
(*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

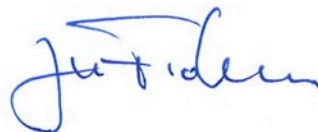
Björn Rissiek

aus Harzberg

Hamburg, Juni 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. F. KOCH-NOLTE
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Tag der Disputation: 27. April 2012

Hamburg, den 12. April 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Gewidmet meinem Großvater

Helmut Rissiek
(1930 - 2010)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Friedrich Koch-Nolte für das interessante und attraktive Thema, welches ich im Rahmen meiner Doktorarbeit bearbeiten durfte. Zudem möchte ich mich bei ihm für die vielen Stunden bedanken, in denen er immer ein offenes Ohr für Fragen und Ideen hatte sowie für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf Kongressen im In- und Ausland präsentieren zu dürfen.

Auch meinen Kollegen am Institut für Immunologie möchte ich an dieser Stelle herzlichst für die schöne Zeit danken, insbesondere Dr. Nicole Schwarz, die mir das Laufen im Labor beigebracht hat, Marion Nissen und Joanna Schmid für tatkräftige Unterstützung durch die Produktion von Antikörpern und VHHs sowie Unterstützung bei der Mausezucht, und allen anderen nicht genannten für die sehr angenehme Atmosphäre im Labor.

Ebenfalls danken möchte ich unseren Kooperationspartnern für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Publikation der Ergebnisse:

Dr. Sahil Adriouch, Dr. Sandra Hubert, Prof. Michel Seman und Prof. Olivier Boyer von der Universität Rouen, Frankreich, sowie Prof. Jochen Hühn und Dr. Katjana Klages vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich immer in meinem Bestreben eine naturwissenschaftliche Doktorarbeit durchzuführen unterstützt haben.

Einen ganz besonderes Dankeschön geht an meine Kollegin, Freundin und zukünftige Ehefrau Anne Schramm, die immer für mich da ist und mein Leben, vor allem jenseits der Laborbank, um ein Vielfaches bereichert hat.

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

Hubert S*, Rissiek B*, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M, Adriouch S.

Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway.

J Exp Med. 2010 Nov 22;207(12):2561-8.

Scheuplein F, Rissiek B, Driver JP, Chen YG, Koch-Nolte F, Serreze DV.

A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes.

J Autoimmun. 2010 Mar;34(2):145-54.

Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F.

Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.

Med Microbiol Immunol. 2009 Aug;198(3):157-74.

Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F.

NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells.

J Immunol. 2009 Mar 1;182(5):2898-908.

* gleicher Beitrag (contributed equally)

2.2.1.2	Injektion von anti-CD25 Antikörpern (PC61) zur in vivo Treg Depletion	35
2.2.1.3	Injektion von NAD	35
2.2.1.4	Implantation von B16 Tumorzellen	35
2.2.1.5	Messung des Wachstums von B16 Tumoren	36
2.2.2	Zellbiologische Methoden	36
2.2.2.1	Präparation von primären Lymphozyten aus Lymphknoten	36
2.2.2.2	Präparation von primären Lymphozyten aus der Milz	37
2.2.2.3	Präparation von primärem Lymphozyten aus Blut	37
2.2.2.4	Präparation von primären Lymphozyten aus B16 Tumorgewebe	37
2.2.2.5	Depletion von B Zellen aus einer heterogenen Zellsuspension	38
2.2.2.6	NAD/ATP <i>in vitro</i> Inkubationsversuche	38
2.2.3	Immunologische Methoden	39
2.2.3.1	Durchflusszytometrie	39
2.2.3.2	Strategien zur Charakterisierung von Zellpopulation (<i>gating</i> Strategien)	39
2.2.3.3	Anfärbung von Zelloberflächenproteinen auf Leukozyten	41
2.2.3.4	Anfärbung von intrazellulären Proteinen in Leukozyten	41
2.2.3.5	Echtzeit-Durchflusszytometrie	42
2.2.3.6	<i>In vitro</i> T Zell Suppressionsversuch	42
3.	Ergebnisse	45
3.1	Vergleichende Analyse von Tregs und Thelp bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber extrazellulären Nukleotiden	45
3.1.1	In DEREK Mäusen können Tregs über die Expression von GFP von Thelp unterschieden werden	45
3.1.2	Tregs exprimieren höhere Level an P2X7, CD38, CD39 als Thelp	47
3.1.3	Tregs reagieren schon auf geringe Mengen NAD mit Externalisation von PS und Abspaltung von CD27	48
3.1.4	Tregs reagieren schnell auf NAD ⁺ und ATP mit PS flashing und CD27 Abspaltung	52
3.1.5	Tregs zeigen als Reaktion auf NAD ⁺ und ATP einen starken Calcium-Einstrom, welcher zeitlich mit der Abspaltung von CD62L korreliert	53
3.1.6	Tregs aus C57BL/6 Mäusen sind empfindlicher gegenüber NAD ⁺ als Tregs aus Balb/c und DBA/1 Mäusen	55

3.2	Untersuchung des Einflusses des bei der Zellpräparation freigesetzten NADs auf die Funktion der Tregs sowie des Einflusses ART2-inhibierender Nanobodies	58
3.2.1	Bei der Präparation freigesetztes NAD ⁺ induziert die ART2-abhängige Apoptose von Tregs	58
3.2.2	ART2-blockierende Nanobodies schützen Tregs vor der NAD-induzierten Apoptose	59
3.2.3	Bei der Zellpräparation freigesetztes NAD ⁺ hemmt die Suppressorfunktion von Tregs	62
3.2.4	Die Blockade der präparationsbedingte ADP-Ribosylierung von P2X7 auf Tregs durch s+16a wirkt sich positiv auf die Suppressorfunktion der Tregs aus	64
3.3	<i>In vivo</i> Manipulation von Tregs durch NAD⁺ Injektion und funktionelle Analyse der Auswirkung anhand des B16 Tumor Mausmodells	68
3.3.1	Die Injektion von NAD ⁺ führt zu einer relativen Abnahme von Tregs <i>in vivo</i>	68
3.3.2	B16 Tumore in NAD ⁺ behandelten Mäusen zeigen ein vermindertes Wachstum	70
3.3.3	Tumor-infiltrierende Effektor T Zellen in NAD ⁺ behandelten Mäusen zeigen einen aktivierten Phänotyp	72
4.	Diskussion	74
4.1	Mögliche Ursache und funktionelle Bedeutung der hohen NAD ⁺ Sensitivität von Tregs	78
4.2	Bei der Präparation freigesetztes NAD ⁺ hat Einfluss auf die Funktion der präparierten Tregs	74
4.3	Die Injektion von NAD ⁺ ist eine effiziente Methoden zur Ausschaltung von Tregs <i>in vivo</i>	80
4.4	Ausblick	83
5.	Abkürzungsverzeichnis	84
6.	Literatur	85

Zusammenfassung

NAD⁺ und ATP haben neben ihren intrazellulären Funktionen im Energiestoffwechsel auch extrazelluläre Funktionen als Gefahrensignale bei Entzündungen und Gewebeschädigungen. In Vorarbeiten war der P2X7 Ionenkanal als ein wichtiger Sensor für diese Nukleotide identifiziert worden. Die Aktivierung von P2X7 erfolgt über den löslichen Liganden ATP oder über eine NAD-abhängige Proteinmodifikation: die durch das membranständige Ectoenzym ART2 katalysierte Übertragung der ADP-Ribose-Gruppe von NAD⁺ auf Arginin 125 von P2X7. Vorarbeiten wiesen ferner darauf hin, dass verschiedenen Subpopulationen von CD4⁺ T Zellen unterschiedlich stark auf extrazelluläre Nukleotide reagieren.

Ziel dieser Arbeit war die molekulare Charakterisierung der unterschiedlichen Sensitivität von CD4⁺ Helfer (Thelp) und regulatorischen T Zellen (Tregs) gegenüber extrazellulärem NAD⁺. Expressionsanalysen zeigten, dass Tregs deutlich mehr P2X7 und etwa gleichviel ART2 exprimieren wie Thelp. Dosis-Wirkungs-Analysen zeigten, dass sowohl Tregs als auch Thelp konzentrationsabhängig auf NAD⁺ reagieren, die halbmaximale NAD⁺ Dosis aber bei Tregs ca. 100fach niedriger liegt als bei Thelp. Die fehlende Reaktion von Zellen aus ART2ko und P2X7ko Mäusen bestätigte die zentrale Rolle von ART2 und P2X7 für die NAD-Sensitivität von Tregs. Calciumflux Untersuchungen zeigten, dass NAD⁺ einen stärkeren und schnelleren Influx von Calcium Ionen bei Tregs als bei Thelp auslöst.

Detaillierte Analysen der P2X7-abhängigen Externalisation von Phosphatidylserin und der P2X7-abhängigen Abspaltung von CD27 zeigten, dass bereits bei der Zellpräparation freigesetztes NAD⁺ die Funktion von Tregs erheblich beeinflusst. Vergleichende Untersuchungen von WT und ko Mäusen zeigten ferner, dass das freigesetzte NAD⁺ auch die Vitalität und die Suppressorfunktion von WT Tregs nicht aber von ART2ko und P2X7ko Tregs erheblich beeinträchtigt. Tregs aus CD38ko Mäusen hingegen zeigten eine erhöhte Sensitivität, die vermutlich mit der fehlenden NAD-Hydrolyse Aktivität des CD38 zusammen hängt. Die intravenöse Injektion eines ART2-blockierenden Nanobodies bewahrte WT und CD38ko Tregs vor der Beeinträchtigung durch freigesetztes NAD⁺.

Die hohe Sensitivität der Tregs gegenüber extrazellulärem NAD⁺ bietet einen potentiellen Ansatzpunkt für die pharmakologische Manipulation dieser Zellen *in vivo*. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass das Ausschalten von Tregs durch Antikörper oder Toxine das Gleichgewicht von Tregs zu Effektor T Zellen (Teff) zugunsten der Teff verschieben und einen positiven Effekt auf die Tumorabwehr haben kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung von Mäusen mit NAD⁺ ebenso das Treg/Teff Gleichgewicht zugunsten der Teff verschiebt. Im B16 Tumor Mausmodell ermöglichte dies die Etablierung einer effektiveren anti-Tumor Immunantwort und bewirkte damit ein langsames Tumorwachstum.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis der Rolle von extrazellulärem NAD⁺ als Gefahrensignal für CD4⁺ T Zellen bei. Darüber hinaus eröffnen sie die pharmakologische Nutzung von NAD-Injektionen für das Ausschalten von Tregs *in vivo* sowie von Injektionen ART2-blockierender Nanobodies zum Schutz von Tregs vor der Beeinträchtigung durch freigesetztes NAD⁺.

Summary

Next to their intracellular functions in energy metabolism, NAD⁺ and ATP also serve as extracellular danger signals during inflammation and tissue damage. The P2X7 ion channel has been implicated as an important sensor for these nucleotides. P2X7 is gated upon binding of its soluble ligand, ATP, or by an NAD-dependent post-translational protein modification involving transfer of the ADP-ribose moiety from NAD⁺ onto Arginine 125, catalysed by the membrane-bound ecto-enzyme ART2. It has been reported that sub-populations of CD4⁺ T cells react differently to these extracellular nucleotides.

The main goal of this thesis was to molecularly characterize the different sensitivities of CD4⁺ T helper cells (Thelp) and regulatory T cells (Tregs) to extracellular NAD⁺. Flow cytometry analyses revealed higher P2X7 cell surface levels on Tregs than Thelp and comparable cell surface ART2 levels on both populations. Dose-response analyses demonstrated that Tregs and Thelp both react to NAD⁺ in a dose-dependent manner with externalization of phosphatidylserine and shedding of CD27 and CD62L. The half maximal NAD⁺ dose required to induce these effects on Tregs was approximately 100 fold lower than that for Thelp (0.5 vs. 50 μ M). The absence of any reaction to NAD⁺ by Tregs from ART2ko and P2X7ko mice underlines the central role of the ART2 ectoenzyme and the P2X7 ion channel in mediating NAD⁺ sensitivity of Tregs. Flow cytometry analyses demonstrated that NAD⁺ mediated a more rapid and stronger influx of Calcium ions in Tregs than in Thelp. Comparative analyses of cells prepared from WT mice and mice deficient in ART2, P2X7 and CD38, the major ecto-NADase, suggested that NAD⁺ released during cell preparation sufficed to substantially affect Treg functions. Moreover, comparative analyses of WT and ko mice showed that the released NAD⁺ impaired cell vitality and the suppressor function of WT Tregs but not of ART2ko or P2X7ko Tregs, whereas Tregs from CD38ko mice showed a higher sensitivity, most likely attributable to the missing NAD-hydrolase activity of CD38. The intravenous injection of ART2-blocking Nanobodies protected WT and CD38ko Tregs from the inhibitory effects of NAD⁺ released during cell preparation.

The high sensitivity of Tregs towards extracellular NAD⁺ offers a potential approach for pharmacologically manipulating these cells *in vivo*. Previous reports using antibodies or toxins to shift the balance of Tregs vs. T effector cells (Teff) in favour of Teff demonstrated that this strategy could be exploited to enhance the anti-tumor response in mouse tumor models. The results shown here demonstrate that systemic injections of NAD⁺ into WT and CD38ko mice similarly shift the Treg/Teff balance toward Teff, and results in slower tumor progression in the B16 mouse melanoma model, reflected in a higher ratio of activated tumor-infiltrating effector cells.

The results of this thesis further our understanding of the role of extracellular NAD⁺ as a danger signal for CD4⁺ T cells. In addition, they demonstrate the feasibility of new pharmacological approaches to inhibit Tregs *in vivo* using NAD⁺ and, conversely, to protect Tregs from the inhibitory effects of NAD⁺ released during cell preparation using ART2-blocking Nanobodies.

1. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von extrazellulären Nukleotiden auf Zellen des Immunsystems untersucht werden. Im Fokus dieser Analyse stehen die CD4⁺ T Lymphozyten (T Zellen) des adaptiven Immunsystems, zu denen die T Helferzellen (Thelp) und die regulatorischen T Zellen (Tregs) gehören. Diese beiden Zellpopulationen sollten bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber den extrazellulären Nukleotiden, Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) und Adenosintriphosphat (ATP), vergleichend untersucht werden.

Der wissenschaftliche Hintergrund für diese Arbeit gliedert sich in drei Kapitel. Im ersten Teil wird die Funktion des Immunsystems erläutert. Der Fokus liegt dabei auf den T Zellen des adaptiven Immunsystems. Zudem wird die Rolle der Tregs, als wichtige Komponente in der Regulation des Immunsystems, erörtert. Im zweiten Teil werden extrazelluläre Nukleotide und ihre Bedeutung für das Immunsystems erläutert. Dabei wird erklärt, wie Nukleotide freigesetzt werden, welche Rezeptoren an der Erkennung von extrazellulären Nukleotiden beteiligt sind und welche Konsequenzen speziell die Aktivierung des P2X7 Rezeptors auf T Zellen hat. Im dritten Teil wird abschließend dargestellt, wie der Einfluss von extrazellulären Nukleotiden durch den Einsatz von *Nanobodies* limitiert werden kann.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem eines Lebewesens besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen zellulären und nicht-zellulären Komponenten, deren Aufgabe es ist die Unversehrtheit dieses Organismus zu gewährleisten. Diese wird kontinuierlich durch Umwelteinflüsse beeinträchtigt. Die Möglichkeiten der Schädigung durch äußere Einflüsse sind extrem vielseitig. So können Viren wie z.B. das Influenza Virus in Zellen des Wirts eindringen, sich dort vermehren, anschließend im Körper verbreiten und weitere Zellen infizieren. Zudem gibt es intrazelluläre Bakterien wie *Listeria monozytogenes*, die ebenfalls Zellen befallen können (Hamon *et al.*, 2006). Extrazelluläre Bakterien wie *Corynebakterium diphtheriae* hingegen siedeln sich extrazellulär in den verschiedenen Organen eines Lebewesens an und beeinträchtigen dadurch deren Funktion (Darai *et al.*, 1997). So können Toxine wie z.B. das Diphtherietoxin freisetzen, welches für den Organismus schädlich ist. Auch mehrzellige Parasiten wie Bandwürmer stellen eine potentielle Bedrohung dar. So kann eine Infektion mit *Diphyllobothrium latum* zu lokalen Beeinträchtigungen des Verdauungstraktes führen, aber sich gleichzeitig auch systemische auf die Blutbildung des Organismus durch den Entzug von Vitamin B12 auswirken (Darai *et al.*, 1997). Neben der Bedrohung durch pathogene Mikroorganismen besteht zudem die Gefahr, dass sich körpereigene Zellen durch die Einwirkung von Chemikalien oder ionisierender Strahlung verändern, was unkontrolliertes Wachstum und die Bildung von Tumoren zur Folge haben kann. Diese Beispiele beschreiben nur einen winzigen Bruchteil dessen, mit dem das Immunsystem Tag für Tag konfrontiert wird. Erschwerend kommt hinzu, dass zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Einflüssen unterschieden werden muss. So gilt es z.B. Immunreaktionen gegen

über die Nahrung aufgenommene harmlose Stoffe zu verhindern oder potentiell nützliche Bakterien der Darmflora als solche zu erkennen und zu tolerieren. Schlägt dieses fehl, so können Allergien entstehen. Ebenso muss das Immunsystem fähig sein zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Gelingt diese Unterscheidung nicht, kommt es zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen. Das Immunsystem muss somit in der Lage sein äußere Einflüsse zu detektieren, zu bewerten und abschließend angemessen darauf zu reagieren. Erreicht wird dies durch ein komplexes System an Zellen und Molekülen, welches im angeborenen und adaptiven Immunsystem organisiert ist. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen fast ausschließlich die Zellen des adaptiven Immunsystems betreffen, beschränkt sich die weitere Erläuterung des Immunsystems auf das adaptive Immunsystem.

1.1.1 Das adaptive Immunsystem

Es wird angenommen, dass bis zu 90% aller Infektionen durch das angeborene Immunsystem eliminiert werden (Ezekowitz and Hoffmann, 1996). Kann das angeborene Immunsystem die Infektion jedoch nicht schnell genug beseitigt, so wird das adaptive oder auch spezifische Immunsystem aktiv. Dieses benötigt bis zur vollen Ausbildung einer adaptiven Immunantwort zwischen drei und fünf Tagen. Verglichen mit dem angeborenen Immunsystem zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch eine hohe Pathogenspezifität, eine große Flexibilität bezüglich der Anpassung an veränderte oder gänzlich neue Pathogene, sowie durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Die beiden wesentlichen Zelltypen des adaptiven Immunsystems bilden die B Lymphozyten (B Zellen) und die T Lymphozyten (T Zellen). Die B Zell-vermittelte Immunantwort besteht in der Produktion von Antikörpern, welche Antigene im extrazellulären Bereich spezifisch binden, markieren und neutralisieren können. Antikörper sind in der Lage sowohl Proteine, als auch Glykoproteine, Polysaccharide, Lipide und sogar DNA zu erkennen (Yano *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 1992; Hahn, 1998). Da T Zellen ein wesentlicher Bestandteil der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung sind, wird die T Zell-vermittelte Immunantwort im folgenden Unterkapitel ausführlicher dargestellt.

1.1.2 Die T Zell Immunantwort

Beim Auslösen einer T Zell Immunantwort spielen initial Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine entscheidende Rolle. Als APCs werden Zellen bezeichnet, die Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen, diese proteolytisch spalten und einzelne Peptide auf ihrer Zelloberfläche, eingebunden in den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), präsentieren. Zudem sind APCs mit Rezeptoren zur Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) ausgestattet. Findet im Rahmen der Antigenpräsentation ein Kontakt mit PAMPs statt, wenn es sich z.B. um ein bakterielles Antigen handelt, so führt das zur Vermittlung eines proinflammatorischen Signals. Findet kein Kontakt mit PAMPs statt, weil

es sich um ein körpereigenes Peptid handelt, wird ein anti-inflammatorisches Signal vermittelt (Guermontprez *et al.*, 2002).

Phagozytieren APCs in der Peripherie antigenes Material wie z.B. Viruspartikel, wandern sie anschließend in das nächstliegende lymphatische Organ und präsentieren es als Peptid-MHC-Komplex auf ihrer Zelloberfläche. Zielzellen dieser Antigenpräsentation sind die T Zellen. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den T Zell Rezeptor (TZR). Dabei exprimiert jede T Zelle eine einzige Variante dieses hochvariablen Rezeptors. Diese Variabilität wird dabei durch die somatische Rekombination verschiedener Gensegmente im Rahmen der Transkription erreicht. Mit dem TZR können T Zellen Peptide im Kontext von MHC-I oder MHC-II erkennen, welche ihnen von den APCs präsentiert werden. Dabei erkennt jeder TZR in der Regel ein bestimmtes Peptid (Stephen J Turner, 2009). Die TZR-MHC Interaktion ist der erste Schritt in Richtung T Zell Aktivierung. Für die vollständige Ausbildung einer T Zell Immunantwort sind insgesamt drei Signale notwendig (Goral, 2011). Findet die APC im lymphatischen Organ die T Zelle mit dem passenden TZR, so wird das erste Signal (Aktivierung) über die TZR/MHC Bindung an die T Zelle übermittelt. Handelt es sich z.B. um ein virales Antigen, so erkennen APCs diese aufgrund der viralen PAMPs und regulieren kostimulatorische Moleküle, wie CD80 und CD86, auf ihrer Zelloberfläche hoch (Schwarz *et al.*, 2003). Binden CD80/CD86 an CD28 auf der T Zelloberfläche, so wird der aktivierten T Zelle das zweite Signal übermittelt (Überleben/Proliferation). Das dritte Signal besteht in der Sekretion von Zytokinen durch die APCs, was zu einer weiteren Differenzierung der aktivierten T Zelle führt (Thomas, 2004).

CD8⁺ zytotoxische T Zellen

T Zellen können anhand ihrer Spezifität für MHC-I oder MHC-II in zwei große Populationen unterteilt werden. Die zytotoxischen T Zellen (CTL) erkennen mit ihrem TZR Peptide im Kontext von MHC-I und tragen zudem den MHC co-Rezeptor CD8. Werden CD8⁺ CTLs durch APCs im lymphatischen Organ aktiviert, wandern sie aus und untersuchen MHC-I exprimierende Zellen in der Peripherie. Ist eine Zelle mit einem Virus infiziert, so präsentiert sie virale Peptide auf der Zelloberfläche im MHC-I Komplex. Die aktivierten CD8⁺ CTL erkennen den Peptid-MHC-Komplex und lysieren anschließend die infizierte Zelle durch die Sekretion von zytotoxischen Effektormolekülen, wie Perforin und Granzym. Neben Virus-infizierten Zellen stellen auch Tumorzellen Ziele für die CD8⁺ CTL dar (Weigelin *et al.*, 2011). Die Bedeutung von CD8⁺ CTLs in der anti Tumor Immunantwort wurde im Rahmen dieser Arbeit am B16 Tumor Mausmodell untersucht.

CD4⁺ T Helfer Zellen

Die zweite große T Zellpopulation sind die CD4⁺ T Helfer Zellen (Thelp). Diese Zellen erkennen Peptide im Kontext von MHC-II und exprimieren den MHC co-Rezeptor CD4. Werden Thelp durch APCs aktiviert, so können sie in verschiedene CD4⁺ Subpopulationen differenzieren (Nakayamada *et al.*, 2012). Diese Differenzierung wird über die APC

vermittelte Sekretion von Zytokinen im Zusammenhang mit dem dritten Signal vermittelt. So differenzieren CD4⁺ Thelp in Gegenwart von Interleukin 12 (IL-12) und Interferon gamma (IFN γ) zu T_H1 Zellen. Diese Subpopulation kann Makrophagen aktivieren um intrazelluläre Bakterien abzutöten. Ferner können T_H1 Zellen B Zellen aktivieren, welche hierdurch zur Antikörperproduktion stimuliert werden. Auch T_H2 Zellen, welche durch die Differenzierung von CD4⁺ T Zellen unter Stimulation mit IL-4 entstehen, tragen zur B Zell Aktivierung bei. Eine dritte Population von CD4⁺ T Zellen sind T_H17 Zellen. Sie entstehen durch Stimulation von naiven CD4⁺ T Zellen mit *transforming growth factor beta* (TGF- β) und IL-6. T_H17 Zellen spielen u.a. im Rahmen der Beseitigung von extrazellulären Bakterien und bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine Rolle.

Alle genannten Subpopulationen von CD4⁺ Thelp bilden den Großteil der Population der CD4⁺ T Zellen. Neben den Thelp gehören aber auch noch die regulatorischen T Zellen (Tregs) zu den CD4⁺ T Zellen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Immunsystems und werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.1.3 Regulation des Immunsystems

Aufgabe des Immunsystems ist es, die Unversehrtheit des Organismus zu gewährleisten. Dabei gilt es ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Immunantwort und Immuntoleranz zu etablieren. Dieses Gleichgewicht ist von enormer Bedeutung. Verschiebt es sich in Richtung Immuntoleranz, so können Pathogene nicht effektiv bekämpft werden. Eine Verschiebung in Richtung Immunantwort führt zu einer heftigen Immunreaktion gegen harmlose Stoffe, wie z.B. bei einer Pollenallergie, oder einer Immunreaktion gegen körpereigene Strukturen, wie z.B. beim Diabetes Typ I. Zur Verhinderung dieser autoreaktiven Reaktionen existieren immunregulatorische Mechanismen um eine Selbsttoleranz zu gewährleisten. Bei der Toleranz gegenüber Eigenantigenen unterscheidet man zentrale und periphere Toleranzmechanismen (Li and Boussiotis, 2006).

Im Rahmen der zentralen Toleranz wird die Entstehung von autoreaktiven T Lymphozyten verhindert. Vorläuferzellen von T Zellen wandern vom Knochenmark über die Blutbahn in den Thymus und werden dort zwei Selektionsschritten unterworfen. Im ersten Selektionsschritt erhalten nur jene T Zellen ein positives Überlebenssignal, welche mit ihrem TZR Peptid-MHC Komplexe erkennen können (positive Selektion). In einem zweiten Schritt werden all die T Zellen deletiert, deren TZR mit hoher Affinität an den Peptid-MHC-Komplex binden (negative Selektion) (Starr *et al.*, 2003). Durch die zentrale Toleranz wird somit verhindert, dass autoreaktive T Zellen heranreifen und anschließend eine Immunreaktion gegen körpereigene Antigene auslösen. Da dieser Prozess die Entstehung von autoreaktiven T Zellen nicht vollständig verhindern kann, ist neben der zentralen Toleranz die periphere Toleranz nötig, um den geringen Anteil an potentiell schädlichen T Zellen unter Kontrolle zu halten (Kyewski and Klein, 2006).

Zur peripheren Toleranz gehören T Zell intrinsische und extrinsische Mechanismen (Walker and Abbas, 2002). Ignoranz und Anergie stellen zwei intrinsische Mechanismen dar. Bei der

Ignoranz gegenüber Autoantigenen ist das Antigen in der Regel schwer zugänglich oder liegt in zu geringen Konzentrationen vor, als dass es zu einer T Zell Aktivierung kommen könnte (Zinkernagel, 1996). Als anerg werden T Zellen bezeichnet, welche Autoantigene mit ihrem TZR erkennen aber kein kostimulatorisches Signal erhalten und somit funktionell inaktiv werden (Jenkins and Schwartz, 1987). Einen weiteren effektiven Mechanismus zur Neutralisierung autoreaktiver T Zellen bildet zudem die Induktion des programmierte Zelltods über die Aktivierung des Fas Rezeptors. Aktivierte T Zellen exprimieren den Fas Rezeptor (FasR) und können durch die Bindung von Fas Liganden (FasL) in die Apoptose getrieben werden.

Zu den extrinsischen Mechanismen der peripheren Toleranz gehören Zellen mit aktiv immunsuppressiven Eigenschaften. Hierzu zählen tolerogene dendritische Zellen (Steinman *et al.*, 2003) und die regulatorischen T Zellen (Sakaguchi, 2004).

1.1.3.1 CD4⁺ regulatorische T Zellen

Regulatorische T Zellen sind eine heterogene Gruppe von T Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften. Neben den Typ 1 regulatorischen T Zellen (Tr1), den T Helfer 3 Zellen (Th3) und den induzierten regulatorischen T Zellen (iTregs) bilden die natürlichen CD4⁺ regulatorischen T Zellen (Tregs) die wichtigste T Zell Population mit immunregulatorischen Funktionen (Shalev *et al.*, 2011). CD4⁺ Tregs spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Sie entwickeln sich ähnlich wie CD4⁺ Thelp im Thymus (Itoh *et al.*, 1999). Diese Reifung im Thymus ist für die funktionelle Entwicklung der Tregs essentiell. Das zeigt sich am Beispiel von Mäusen, denen der Thymus an Tag drei nach der Geburt entfernt wurde. Diese thymectomierten Mäuse zeigen einen lethalen, autoimmunen Phänotyp, welcher durch einen adaptiven Transfer von CD4⁺ Tregs verhindert werden konnte (Asano *et al.*, 1996). Ab Tag drei nach der Geburt wandern die Tregs aus dem Thymus in die Peripherie und bilden dort rund 10% der CD4⁺ T Zellen im Blut und in den lymphatischen Organen (Sakaguchi, 2004).

1.1.3.2 Phänotypisierung von CD4⁺ Tregs

CD4⁺ Tregs lassen sich anhand bestimmter Marker phänotypisch von anderen CD4⁺ T Zellen unterscheiden. So exprimieren CD4⁺ Treg große Mengen der IL-2 Rezeptor alpha Kette (CD25), welche von naiven CD4⁺ Thelp nicht exprimiert wird. CD25 bildet in Kombination mit CD122 und CD132 den heterotrimeren IL-2 Rezeptor Komplex, welcher IL-2 hochaffin bindet (Cheng *et al.*, 2011). In der Peripherie benötigen Tregs IL-2 als Wachstumsfaktor (Malek *et al.*, 2002), sind dabei aber auf die IL-2 Produktion durch andere Zellen angewiesen, da sie IL-2 nicht selbst produzieren können (Thornton and Shevach, 1998). Werden CD4⁺ Thelp aktiviert, so produzieren sie große Mengen an IL-2. Gleichzeitig beginnen sie CD25 auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Eine Unterscheidung zwischen CD4⁺ Tregs und aktivierten CD4⁺ Thelp über die CD25 Expression ist somit nur noch schlecht möglich. Dadurch ist CD25 als alleiniger Marker für Tregs nur bedingt geeignet.

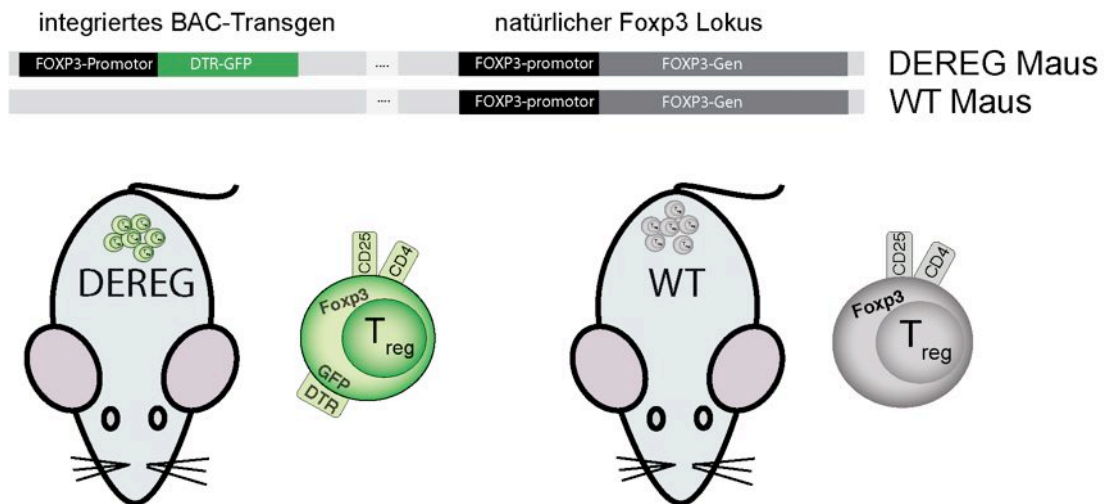


Abb. 1.1 Regulatorische T Zellen in der DEREK Maus

Die DEREK Maus trägt ein transgenes *bacterial artificial chromosome* (BAC) integriert in ihrem Genom, welches ein GFP-Diphtherietoxinrezeptor Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3 Genlocus exprimiert. Foxp3 exprimierende CD4⁺ Tregs können somit über die Expression von GFP charakterisiert werden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, diese Zellpopulation durch eine Injektion von Diphtherietoxin *in vivo* zu depletieren.

Eine eindeutige Zuordnung ist über die kombinierte Analyse der CD25 und IL7 Rezeptor alpha Kette (CD127) möglich. So exprimieren CD4⁺ Tregs im Vergleich zu anderen CD4⁺ T Zellen nur geringe Mengen an CD127 (Seddiki *et al.*, 2006) und werden somit phänotypisch als CD25^{high}CD127^{low} charakterisiert.

Ein weitere Möglichkeit CD4⁺ Tregs zu charakterisieren ist die Expressionsanalyse des *forkhead box protein 3* (Foxp3). Bei Foxp3 handelt es sich um einen intrazellulären Transkriptionsfaktor, welcher nahezu ausschließlich von CD4⁺ Tregs exprimiert wird (Fontenot *et al.*, 2005). Welche Bedeutung Foxp3 für die Entwicklung und Funktion der CD4⁺ Tregs spielt, zeigt sich in verschiedenen Krankheitsbildern und Tiermodellen. So zeigen Menschen mit einem genetischen Defekt im Foxp3 Gen eine Dysregulation des Immunsystems, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX Syndrom) (Le Bras and Geha, 2006). Ein ähnliches Krankheitsbild findet sich auch in der *scurfy* Maus wieder. Die spontane *scurfy* Mutation führt zum Funktionsverlust von Foxp3, was sich in der unkontrollierten Proliferation von CD4⁺ T Zellen, der verstärkten Infiltration dieser Zellen in verschiedensten Organen und erhöhten Werten verschiedenster proinflammatorischer Zytokine, einhergehend mit einer frühzeitigen Lethalität äußert (Brunkow *et al.*, 2001).

In der Maus ist Foxp3 mitunter der verlässlichste Marker für CD4⁺ Tregs. Da Foxp3 ein intrazellulärer Marker ist, kann er in Immunfluoreszenz-basierten Analysen nur in fixierten, nicht-vitalen Tregs nachgewiesen werden. Um das Problem der Fixierung zu umgehen, wurden verschiedene transgene Reportermause entwickelt, welche fluoreszente Proteine wie das *green fluorescent protein* (GFP) unter der Kontrolle des Foxp3 Genlocus exprimieren (Fontenot *et al.*, 2005; Wan and Flavell, 2005; Lahl *et al.*, 2007). Die DEREK Maus (Abk. *Depletion of Regulatory T cells*) publiziert von Lahl *et al.* exprimiert ein GFP-

Diphtherietoxinrezeptor (GFP-DTR) Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3 Genlocus. Foxp3 exprimierende Tregs können in dieser Maus durch die GFP Expression von anderen CD4⁺ T Zellen unterschieden werden (Abb. 1.1). Aufgrund der Expression des DTR sind diese Zellen empfindlich gegen über dem Diphtherietoxin (DT). Somit besteht die Möglichkeit Foxp3 exprimierende Tregs durch eine DT Injektion gezielt *in vivo* zu depletieren. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden fast ausschließlich DEREK Mäuse verwendet, da sie eine verlässliche Differenzierung von Tregs und Thelp im vitalen Zustand ermöglichen.

1.1.3.3 Immunsuppressive Mechanismen regulatorischer T Zellen

CD4⁺ Tregs verfügen über verschiedenste Mechanismen zur Unterdrückung von Immunreaktionen (Übersichtsartikel (Vignali *et al.*, 2008). Durch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen haben Tregs die Möglichkeit ohne direkten Zell-Zell Kontakt die Aktivierung von Effektor T Zellen in der unmittelbaren Umgebung zu verhindern oder zu unterdrücken. Drei der wichtigsten von Tregs produzierten immunsuppressiven Zytokine sind IL-10, TGF- β und IL-35.

Neben der Suppression von Effektor T Zellen durch Zytokine sind Tregs auch in der Lage Effektor T Zellen zu lysieren. So wurde von Gondek *et al.* 2005 gezeigt, dass Tregs im Rahmen der Aktivierung Granzym B hochregulieren (Gondek *et al.*, 2005). Granzym B ist eine Serinprotease, welche in Form von zytoplasmatischen Granula sekretiert wird, an andere Zellen bindet und Apoptose induziert (Bots and Medema, 2006). Ein weiterer immunsuppressiver Mechanismus von Tregs stellt der Entzug oder die Modifikation von lebenswichtigen Metaboliten oder Wachstumsfaktoren dar. So wurde beschrieben, dass Tregs durch die Hochregulierung von CD25 das lokale IL-2 in der Umgebung von Effektor T Zellen „konsumieren“ und diesen so die Basis für die proliferative Expansion entziehen (la Rosa *et al.*, 2004). Auch Nukleotide können von Tregs als immunsuppressive Botenstoffe genutzt werden. So wurde gezeigt, dass extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) über die von Tregs exprimierten ecto-Enzyme ENTPD1 (CD39) und NT5E (CD73) zu Adenosin abgebaut werden kann. Adenosin vermittelt dann über die A_{2A} Rezeptoren auf Effektor T Zellen ein anti-inflammatorisches Signal (Deaglio *et al.*, 2007). Ebenso wurde gezeigt, dass auch intrazelluläre Nukleotide wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) von Tregs für die Immunsuppression von Effektor T Zellen genutzt werden kann. Während des direkten Zell-Zell Kontakts zwischen Treg und Effektor T Zelle wird cAMP über *gap junctions* in die Effektor T Zellen geschleust und wirkt dort als Inhibitor der Proliferation und IL-2 Synthese (Bopp *et al.*, 2007). Neben der direkten Inhibition von Effektor T Zellen können Tregs auch immunsuppressiv auf dendritische Zellen (DCs) wirken, indem sie deren Reifung oder Funktionen beeinträchtigen.

In vitro kann die immunsuppressive Kapazität der Tregs im *in vitro* T Zell Suppressionsversuch bestimmt werden (Collison and Vignali, 2011). Hierbei werden Effektor T Zellen (Teff) von den Tregs getrennt und anschließend mit einem einem

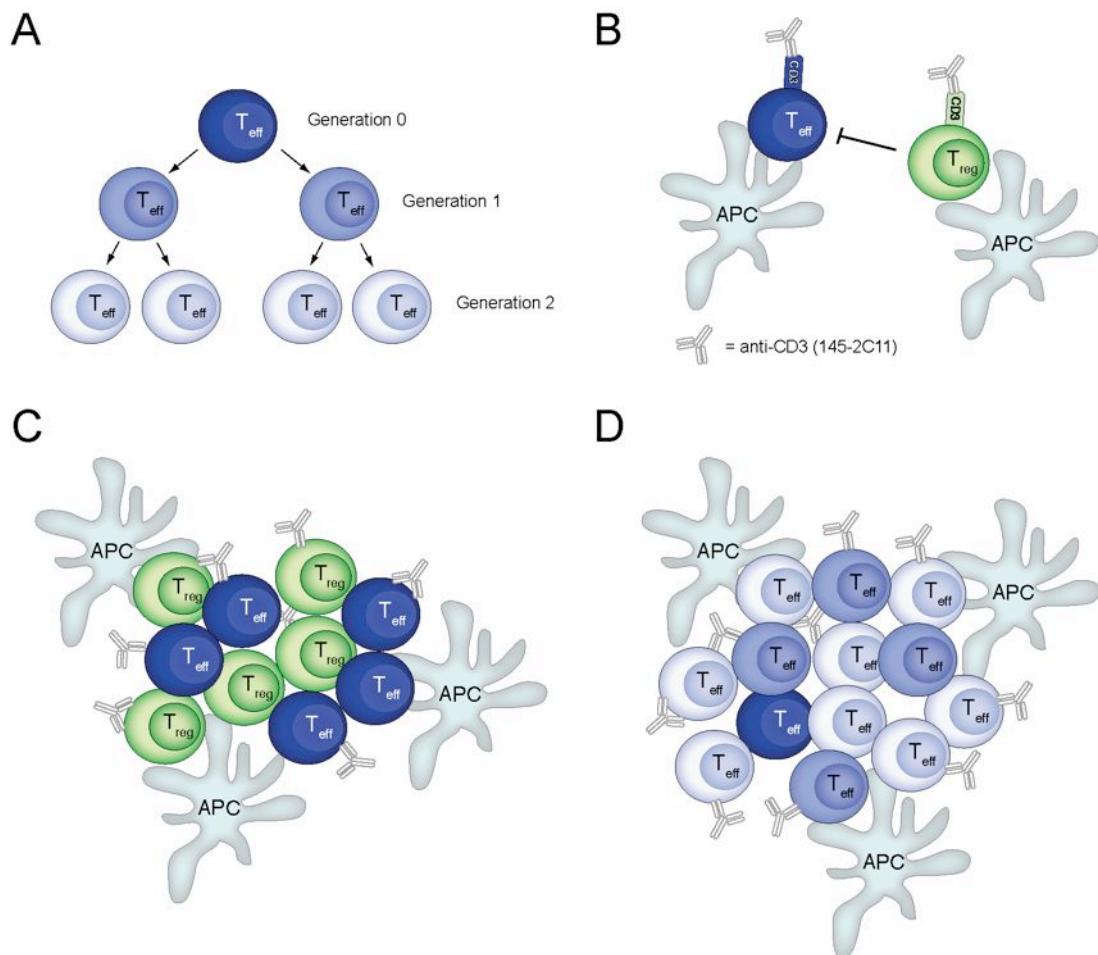


Abb. 1.2 Tregs blockieren die Proliferation von Teff im in vitro T Zellsuppressionsversuch
 (A) Mit eFluor⁶⁷⁰ markierte Effektor T Zellen (Teff) verteilen den fluoreszenten Farbstoff während der Zellteilung gleichmäßig auf beide Tochterzellen. (B) Die Aktivierung von Teff und Tregs erfolgt durch die Bindung des anti-CD3 Antikörpers 145-2C11. (C) Aktivierte Tregs verhindern die Proliferation der Teff, (D) in Abwesenheit von Tregs hingegen proliferieren die Teff.

fluoreszenten Farbstoff wie z.B. eFluor⁶⁷⁰ gefärbt. Dieser Farbstoff verteilt sich bei der Zellteilung gleichmäßig auf beide Tochterzellen, so dass die Fluoreszenz von Generation zu Generation schwächer wird (Abb. 1.2A). Die gefärbten Teff werden dann in bestimmten Verhältnissen zusammen mit den Tregs

bei 37 °C inkubiert und mit einem Antikörper gegen CD3 stimuliert. Dies führt zur Induktion der Proliferation der Teff und zur Aktivierung der Suppressorfunktion der Tregs (Abb. 1.2B). Letztere unterdrücken die Proliferation der Teff in Abhängigkeit vom Verhältnis Tregs/Teff (Abb. 1.2C/D) .

1.1.3.4 Die Rolle von regulatorischen T Zellen in der anti-Tumor Immunreaktion

Tregs sind in der Lage Immunreaktionen effektiv zu unterdrücken und spielen somit eine große Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen. Ihre immunsuppressive Natur ist aber nicht immer von Vorteil für den Organismus. So wurden bei verschiedensten Tumorerkrankungen erhöhte Frequenzen von CD4⁺ Tregs in Blut, Tumorgewebe und Tumor-

drainierenden lymphatischen Organen beschrieben, welche durch ihre immunsuppressive Wirkung die Immunantwort gegen den Tumor unterdrücken (Woo *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2007). Auch im Vergleich mehrerer Patienten mit der gleichen Tumorart, war die Prognose bei Patienten mit hoher Treg Infiltration in den Tumor schlechter, als bei Patienten mit niedriger Treg Infiltrationsrate (Siddiqui *et al.*, 2007).

Die Art und Weise in der Tregs die anti-Tumor Immunreaktion beeinflussen ist sehr facettenreich. So zeigten Boissannas *et al.* 2010 im MCA Tumor Mausmodell, dass CD4⁺ Tregs über die Sekretion von Perforin dendritische Zellen (DCs) in den Tumor-drainierenden Lymphknoten lysieren. Zudem wird vermutet, dass Tumor residente CD4⁺ Tregs Hauptkonsumenten des für Effektor T Zellen wichtige und im Tumorgewebe knappe IL-2 sind (Zou, 2006). Neben Effektor T Zellen können Tregs über die Sekretion von TGF- β zudem tumorresidente NK Zellen in ihrer Funktion inhibieren (Ghiringhelli *et al.*, 2005). Neben den aus dem Thymus hervorgehenden CD4⁺ Tregs spielen aber auch die induzierte iTregs eine Rolle in der Blockade der anti-Tumor Immunantwort (Zhou and Levitsky, 2007). So sind bestimmte Tumorzellen in der Lage die anti-inflammatorische Zytokine IL-10 und TGF- β zu sekretieren. Dies führt *in situ* zur Blockade der Ausreifung von Tumorantigen-präsentierenden DCs (Nolan *et al.*, 2004). Die Folgen sind die verminderte Aktivierung tumorspezifischer, zytotoxischer T Zellen, sowie die Konversion von CD4⁺ T Zellen zu *induced* Tregs (iTregs), welche ihrerseits wieder immunsuppressiv wirken können (Seo *et al.*, 2001).

Aufgrund der negativen Effekte bezüglich einer anti-Tumor Immunreaktion wurden verschiedene Experimente zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung einer *in vivo* Depletion von CD4⁺ Treg im Maus Modell durchgeführt. Turk *et al.* konnten 2004 im B16 Melanom Tumor Mausmodell zeigen, dass die anti-CD4 Antikörper vermittelte Depletion von CD4⁺ T Zellen *in vivo* zu einer verstärkten CD8⁺ T Zell-abhängigen Immunreaktion gegen die implantierten Tumoren führte (Turk *et al.*, 2004). Ein mehr auf Tregs fokussierter Ansatz von Onizuka *et al.* 1999 zeigte, dass durch den Einsatz des anti-CD25 Antikörpers PC61 gezielt die CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vivo* depletiert werden konnten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch die PC61 vermittelte Treg Depletion in verschiedenen Maus Tumormodellen (u.a. EL4, Meth A, CMS17) eine effektive anti-Tumor Immunreaktion ausgelöst werden kann. In einigen Fällen führte diese sogar zur kompletten Abstoßung der Tumoren (Onizuka *et al.*, 1999).

1.2 Extrazellulärer Nukleotide als Modulatoren des Immunsystems

Ein Nukleotid besteht im Wesentlichen aus drei Bestandteilen: einer Nukleobase wie z.B. Adenin, einer Pentose wie z.B. Ribose, sowie einer oder mehrerer Phosphatgruppen (Abb. 1.3). Nukleotide sind Bestandteil der Nukleinsäuren und somit Grundbausteine des Genoms aller Lebewesen. Neben der Kodierung der Erbinformationen erfüllen einige Nukleotide zudem die Funktion eines Energieträgers innerhalb der Zelle. So wird das Adenosintriphosphat (ATP) mit seinen energiereichen Phosphatbindungen als Energiequelle für verschiedene intrazelluläre Arbeitsleistungen, wie die Synthese organischer Moleküle oder den aktiven Stofftransport durch Membranen genutzt. Darüber hinaus wird ATP auch als Kosubstrat in verschiedenen Signaltransduktionswegen genutzt. Proteinkinasen können die letzte Phosphatgruppe des ATPs auf Zielproteine übertragen. Im Rahmen dieser Phosphorylierung wird ATP dann in das energieärmere Adenosindiphosphat (ADP) umgewandelt (Berg *et al.*, 2009). Neben ATP ist das Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) ein weiterer Vertreter der intrazellulären Nukleotide mit Funktionen in der Signaltransduktion. NAD⁺ ist ein Hydridionen übertragendes Koenzym, welches an zahlreichen Redoxreaktionen des zellulären Stoffwechsels beteiligt ist. So wird NAD⁺ im Rahmen des katabolen Glucose- oder Fettstoffwechsels zu NADH reduziert. Das energiereiche NADH dient dann im oxidativen Stoffwechsel als Koenzym in der Atmungskette (Berg *et al.*, 2009).

Die Funktion von Nukleotiden als Signalmoleküle innerhalb der Zelle ist seit vielen Jahrzehnten etabliert. Die Rolle dieser Moleküle außerhalb einer Zelle war lange umstritten. Die Pionierarbeiten von Geoffrey Burnstock in den 70er Jahren über extrazelluläre Nukleotide und ihre Funktionen fanden erst in den 90er Jahren allgemeine Akzeptanz (Burnstock, 1997). Die Arbeiten von Burnstock zeigten, dass ATP als Botenstoff, bei der

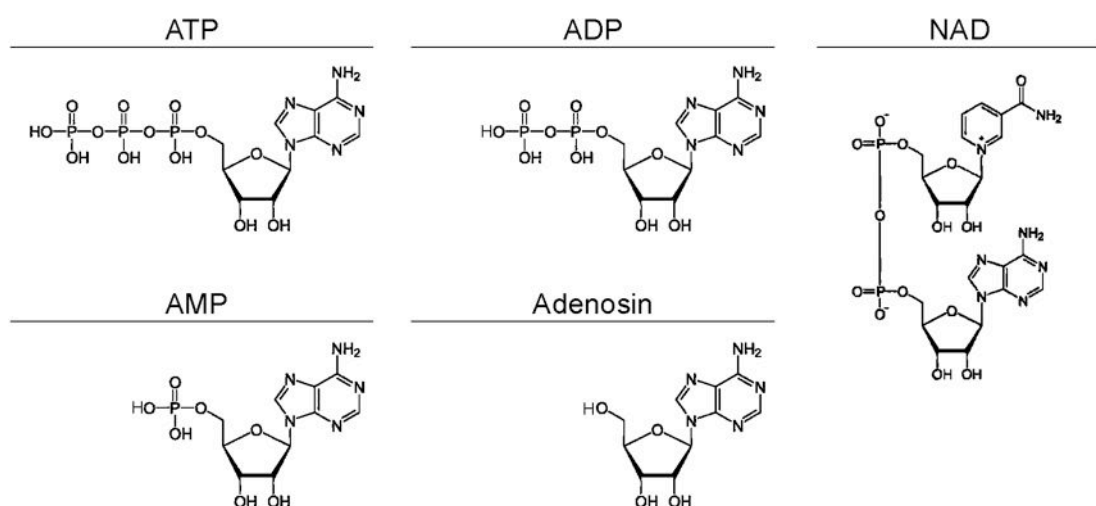


Abb. 1.3 Chemische Struktur verschiedener Adenin Nukleotide

ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat,
NAD = Nikotinamidadenindinukleotid

nicht-adrenerg, nicht-cholinerg Neurotransmission eine wichtige Rolle spielt (Burnstock, 2006). Auch die Entdeckung und Beschreibung der ersten Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide (purinerge Rezeptoren) gehen auf die Arbeiten von Burnstock in den 80er Jahren zurück (Salter and Henry, 1985). Heute ist bekannt, dass extrazelluläre Nukleotide in vielen Systemen des Organismus eine Rolle spielen, so auch im Immunsystem (Di Virgilio, 2005; Di Virgilio *et al.*, 2009; Lin, 2007).

1.2.1 Freisetzung von extrazellulären Nukleotiden

Prinzipiell stellt jede Zelle im Körper eine Quelle für extrazelluläre Nukleotide dar. Durch Zellyse, sei es durch mechanische Einflüsse oder im Rahmen von inflammatorischen Prozessen, wird der Zellinhalt in den extrazellulären Raum freigesetzt. Bestimmte intrazelluläre Komponenten, wie das *High-mobility Group Protein B1* (HMGB1), die *heat shock proteins* (HSPs) oder auch mitochondriale DNA, bilden im extrazellulären Raum Gefahrensignale für das Immunsystem (Abb. 1.4A). Zu diesen sogenannten *danger associated molecular patterns* (DAMPs) zählt auch ATP (Bours *et al.*, 2006). Die Funktionen von extrazellulärem ATP sind sehr vielfältig. So wurde gezeigt, dass von nekrotischen Zellen freigesetztes ATP entscheidend zur Aktivierung des NLRP3 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*) Inflammasoms beiträgt (Iyer *et al.*, 2009). Die Aktivierung dieses Komplexes spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der Produktion von proinflammatorischem IL-1 β durch Makrophagen (Abb. 1.4B) (Martinon *et al.*, 2002). Ferner spielt extrazelluläres ATP eine Rolle bei der T Zell Homöostase, da es Apoptose in naiven T Zellen auslösen kann (Abb. 1.4C) (Scheuplein *et al.*, 2009). Zudem kann extrazelluläres ATP durch ecto-Enzyme auf Tregs, wie in 1.1.3.3. beschrieben, zu Adenosin abgebaut werden, welches immunsuppressiv wirkt (Abb. 1.4D). Neben der passiven Freisetzung durch Zellyse sind auch Mechanismen für die aktiv gesteuerte Freisetzung von ATP beschrieben. Bei aktivierten T Zellen beispielsweise wurde nachgewiesen, dass intrazelluläres ATP über Pannexin 1 Hemikanäle aus der Zelle heraus transportiert wird und so in autokriner Weise für eine weitere Stimulation der T Zelle durch Bindung an purinerge Rezeptoren sorgt (Filippini *et al.*, 1990). Auch für NAD⁺ sind sowohl passive, als auch aktive Mechanismen zur Freisetzung von NAD⁺ in den extrazellulären Raum beschrieben. So wurde von Scheuplein *et al.* 2009 beschrieben, dass Erythrozyten, wenn sie lysiert werden, eine potentielle Quelle für endogenes NAD⁺ darstellen. Ebenso wurde gezeigt, dass Zellyse im Rahmen der Zellpräparation zur Freisetzung von NAD⁺ führt (Abb. 1.4C) (Scheuplein *et al.*, 2009). Adriouch *et al.* 2007 zeigten in einem auf der Injektion von Acrylamid *beads* basierenden lokalen Entzündungsmodell, dass NAD im Rahmen von Entzündungsprozessen freigesetzt wird und das dies vermutlich auf sowohl zellytische, als auch nicht-zellytischer Prozesse zurück zu führen ist (Adriouch *et al.*, 2007). Erste Hinweise auf den aktiven Export von NAD⁺ aus Zellen lieferten Zellkulturexperimente von Bruzzone *et al.* 2001, welche Connexin 43 als Hauptfaktor für den NAD⁺ Export in diesem Modell identifizieren (Bruzzone *et al.*, 2001).

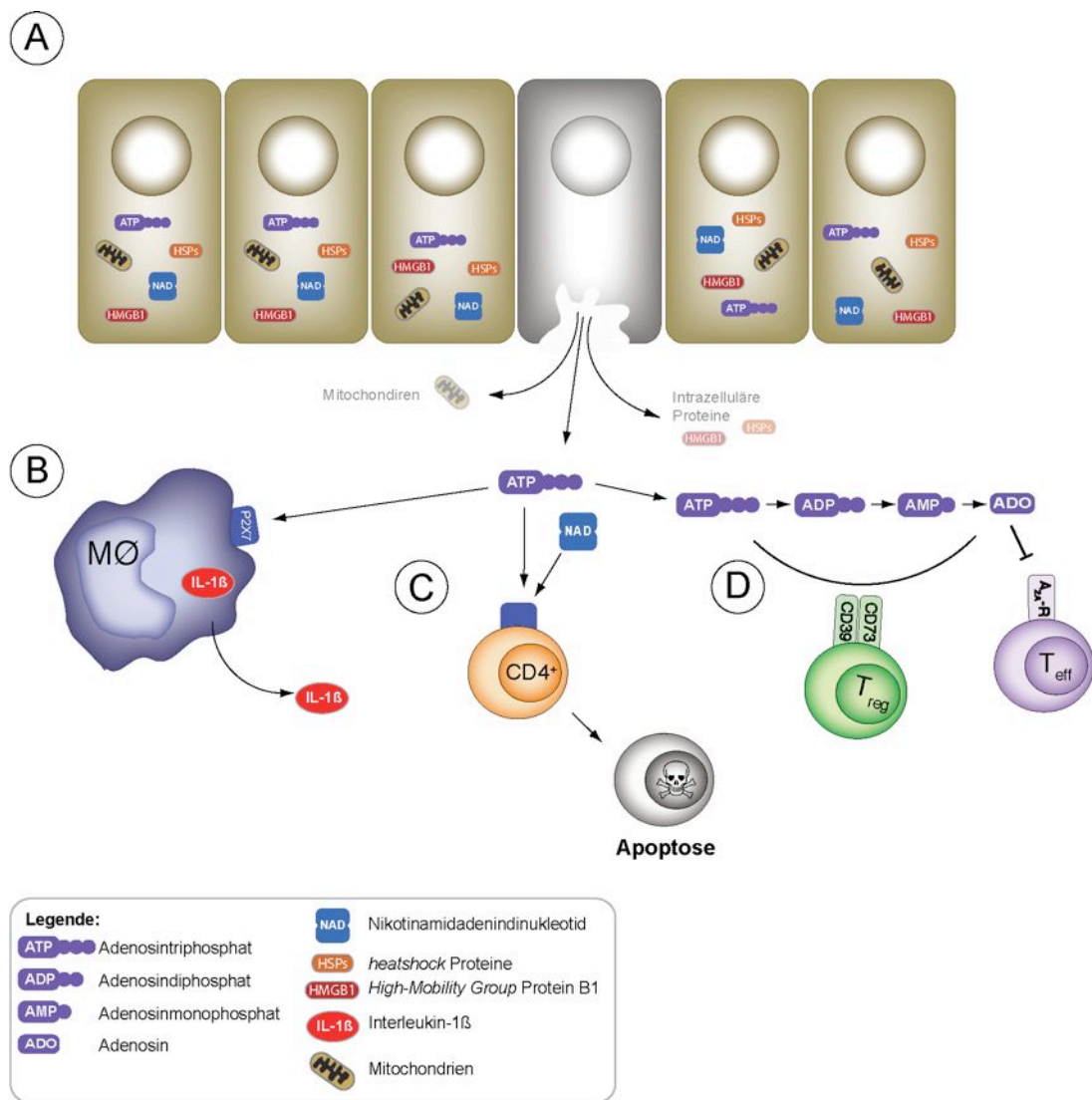


Abb. 1.4 Von nekrotischen Zellen freigesetzte DAMPs werden vom Immunsystem erkannt. Nekrotische Zellen setzen Gefahrensignale in Form von mitochondrialen Komponenten, intrazellulären Proteinen sowie Nukleotiden frei (A). Die Signale, welche extrazelluläre Nukleotide vermitteln, reichen von der Stimulation zur Zytokinsekretion (B) über die Induktion der Apoptose von T Zellen (C) bis hin zur Etablierung eines immunsuppressiven Milieus (D).

1.2.2 Extrazelluläre Nukleotide als Liganden für purinerge Rezeptoren

Die Erkennung von extrazellulären Nukleotiden und die durch sie vermittelte Signaltransduktion erfolgt über die purinergen Rezeptoren (Tab. 1.1). Diese werden anhand ihrer strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften in drei Klassen eingeteilt: P1, P2Y und P2X (Ralevic and Burnstock, 1998). Die vier Vertreter der P1 Klasse (A1, A2a, A2b und A3) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und haben alle Adenosin als Liganden. Die A2a Rezeptoren werden von den meisten Zellen des Körpers exprimiert, ihre Expression ist jedoch auf den Zellen des Immunsystems am höchsten (Gessi *et al.*, 2011). Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass Adenosin über die A2a Rezeptoren ein anti-inflammatorisches Signal an T Zellen vermittelt. Die Bindung von Adenosin an den A2a Rezeptor führt bei aktivierten CD4⁺ T Zellen zur Blockade der IL-2 Produktion und verhindert dadurch die Proliferation dieser Zellen (Naganuma *et al.*, 2006).

Tabelle 1.1 Purinerge Rezeptoren (nach Junger *et al.*, 2007)

Rezeptor	Ligand	Klasse
(P1 Rezeptoren) A1 A2a A2b A3	Adenosin Adenosin Adenosin Adenosin	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
(P2Y Rezeptoren) P2Y1 P2Y2 P2Y4 P2Y6 P2Y11 P2Y12 P2Y13 P2Y14	ATP, ADP ATP, UTP UTP (ATP,UDP) UDP, UTP ATP, NAD ADP ADP, ATP UDP-Glukose	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
(P2X Rezeptoren) P2X1 P2X2 P2X3 P2X4 P2X5 P2X6 P2X7	ATP ATP ATP ATP ATP ATP ATP (ADP-Ribosylierung)	Liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Bei den P2Y Rezeptoren handelt es sich ebenfalls um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Insgesamt sind 12 Vertreter der P2Y Klasse beim Menschen beschrieben (Abbraccio *et al.*, 2006; Harden *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den P1 Rezeptoren können P2Y Rezeptoren meist durch verschiedene Nukleotide aktiviert werden (Tab. 1.1). So hat P2Y2 sowohl ATP als auch UTP als Liganden. Andere P2Y Rezeptoren hingegen können nur selektiv durch ein bestimmtes Nukleotid aktiviert werden. So wird P2Y1 selektiv nur durch ADP stimuliert (Palmer *et al.*, 1998). Für einige P2Y Rezeptoren wurden Funktionen im Zusammenhang mit dem Immunsystem nachgewiesen (Chen *et al.*, 2006b). So haben Mausexperimente gezeigt, dass bestimmte DC Populationen P2Y2 für die Migration entlang eines ATP Gradienten benötigen. Im Mausmodell der asthmatischen Atmenwegsinflammation zeigten P2Y2^{-/-} Mäuse einen wesentlich mildereren Krankheitsverlauf, was auf Migrationsdefekte der DCs zurückgeführt werden konnte (Müller *et al.*, 2010).

P2X Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Struktur und Form deutlich von P1 und P2Y Rezeptoren. Als trimere Komplexe bilden sie ligandengesteuerte Ionenkanäle aus, welche alle durch ATP aktiviert werden können. Die funktionelle Konsequenz dieser Aktivierung ist ein durch Konformationsänderung bedingter Influx von Ionen in die Zelle. P2X Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer ATP Sensitivität teilweise um den Faktor 100. So beträgt die EC₅₀ bei P2X1 ca. 1 µM ATP, bei P2X5 ca. 10 µM ATP und bei P2X7 >100 µM ATP (Li *et al.*, 2008). Für einige P2X Rezeptoren konnten immunmodulatorische Funktionen nachgewiesen werden. So spielt P2X1 auf Granulozyten eine Rolle bei der Chemotaxis (Lecut *et al.*, 2009). P2X7, der im Kontext des Immunsystems wohl am besten untersuchte P2X Rezeptor, wird auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert (Chen and Brosnan, 2006). Auf Makrophagen spielt er eine wichtige Rolle bei der Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 (Ferrari *et al.*, 2006; Dinarello, 2007). Auf T Zellen führt die Aktivierung von P2X7 zum Zelltod (Seman *et al.*, 2003; Scheuplein *et al.*, 2009).

1.2.3 Extrazelluläre Nukleotide als Substrat für ecto-Enzyme

Nukleotide im extrazellulären Bereich unterliegen einem ständigen Abbau durch ecto-Enzyme, welche auf der äußeren Seite der Plasmamembran von Zellen verankert sind (Abb. 1.5A).

Extrazelluläres ATP

Im extrazellulären Raum dient ATP als Substrat für die Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 1 (ENTPD1 oder CD39), welche auf B und T Zellen sowie vaskulären Endothelzellen exprimiert wird. ATP wird dabei sequenziell über ADP zu AMP abgebaut (Dombrowski *et al.*, 1998). Das von CD39 generierte AMP stellt ein Substrat für ein weiteres ecto-Enzym, die ecto-5'-Nukleotidase CD73, dar (Resta *et al.*, 1998). Diese wird ebenfalls auf Lymphozyten und dem vaskulären Endothel exprimiert und kann extrazelluläres AMP zu Adenosin abbauen. ATP, sowie dessen Abbauprodukte ADP und Adenosin bilden Liganden für verschiedene purinerge Rezeptoren.

Extrazelluläres NAD⁺

Extrazelluläres NAD⁺ wird ebenfalls von einem ecto-Enzym abgebaut. Die NAD-Glykohydrolase CD38 kann aus NAD⁺ folgende Spaltprodukte generieren: Nikotinamid, ADP-Ribose (ADPR), und zyklische ADP-Ribose (cADPR) (Ferrero and Malavasi, 1999). CD38 wird von vielen verschiedenen Zelltypen, wie den Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und pankreatischen Inselzellen exprimiert (Krebs *et al.*, 2005) und gilt als das Hauptenzym beim Abbau von extrazellulärem NAD. Wie schnell und effektiv extrazelluläres NAD⁺ *in vivo* abgebaut werden kann verdeutlicht die Arbeit von Broetto-Biazon *et al.* 2009. Sie konnten zeigen, dass die Leber der Maus in der Lage ist, eine 100 µM NAD Lösung in einer einzigen Passage vollständig abzubauen (Broetto-Biazon *et al.*, 2008b).

Neben CD38 gibt es noch eine weitere Familie an ecto-Enzymen, welche NAD als Substrat verwenden: die Familie der mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) (Seman *et al.*, 2004). ARTs sind funktionell und strukturell verwandt mit bakteriellen Toxinen, wie dem Cholera-toxin von *Vibrio cholerae* und katalysieren die posttranslationale Modifikation der ADP-Ribosylierung. Bei dieser Reaktion wird die ADPR Gruppe von NAD⁺ unter Abspaltung von Nicotinamid kovalent an Argininreste verschiedener Zielproteine geknüpft. Säugetiere exprimieren in der Regel fünf verschiedene extrazelluläre ARTs: ART1-ART4 als GPI-verankerte Membranproteine, ART5 als sekretorisches Enzym (Koch-Nolte *et al.*, 2008; Hottiger *et al.*, 2010). Eine Übersicht der in Säugetieren exprimierten ARTs ist in Tabelle 1.2 aufgeführt. Das Maus-Genom kodiert in Folge einer regionalen Genduplikation für zwei ähnliche, funktionstüchtige ART2 Proteine - das ART2.1 Protein wird vorwiegend von Makrophagen, das ART2.2 Protein von T Zellen exprimiert (Hollmann *et al.*, 1996; Koch-Nolte *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2007). Das ART2 Gen des Menschen und anderer Primaten enthält interne Stopcodons, und kann demzufolge nicht als funktionstüchtiges Protein exprimiert werden (Haag, 1994).

Tabelle 1.2 ADP-Ribosyltransferasen der Säugetiere

Name	Gewebe	Ziel / Funktion
ART1	Muskel, Lunge, Neutrophile Granulozyten	Arginin-spezifisch: Integrinen, Defensin, PDGF
ART2.1	Makrophagen (Maus)	Arginin-spezifisch: Wird durch die Reduzierung von Disulfidbrücken aktiviert
ART2.2	T Zellen (Maus)	Arginin-spezifisch: LFA-1, P2X7, CD8
ART3	Hoden	Bislang keine Enzymaktivität nachgewiesen
ART4	Erythrozyten	Bislang keine Enzymaktivität nachgewiesen Trägt das Dombrock Blutgruppen Alloantigen
ART5	Herz, Lymphome	Arginin-spezifisch, bislang keine Zielproteine bekannt, sekretorisches Protein

In der Maus zeigen T Zellen eine starke Zelloberflächen ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Krebs *et al.*, 2005). Sie ist zurückzuführen auf die Expression der GPI-verankerten, *lipid raft* assoziierten ART2 (Koch-Nolte *et al.*, 1999; Bannas *et al.*, 2005). Bislang wurde einige Zielproteine von ART2 identifiziert (Haag *et al.*, 2007). Zu ihnen gehören das Integrin LFA-1, die alpha und beta-Kette von CD8, sowie der purinerge Rezeptor P2X7 (Scheuplein *et al.*, 2009). Für die ADP-Ribosylierung konnte eine funktionelle Relevanz in sofern nachgewiesen werden, als dass sie die Funktion der Zielproteine beeinträchtigen kann. So wurde gezeigt, dass die ADP-Ribosylierung von LFA-1 durch ART2 zum Verlust der Funktion als Adhäsionsmolekül führt (Nemoto *et al.*, 1996), wo hingegen die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 zur Aktivierung des purineren Rezeptors führt (Seman *et al.*, 2003).

1.2.4 P2X7 Aktivierung auf T Zellen durch extrazelluläres ATP und NAD

Die Aktivierung von P2X7 erfolgt sowohl durch die nicht-kovalente Bindung von ATP, als auch durch die kovalente Modifikation der ADP-Ribosylierung, für die NAD⁺ als Substrat nötig ist. Die Folgen der ATP und NAD⁺ vermittelten P2X7 Aktivierung sind in Abbildung 1.5B und 1.5C schematisch dargestellt.

Für die ATP vermittelte P2X7 Aktivierung auf T Zellen sind verglichen mit anderen P2X7 Rezeptoren relativ hohe ATP Konzentrationen (>100 µM) nötig. Hinzu kommt, dass eine

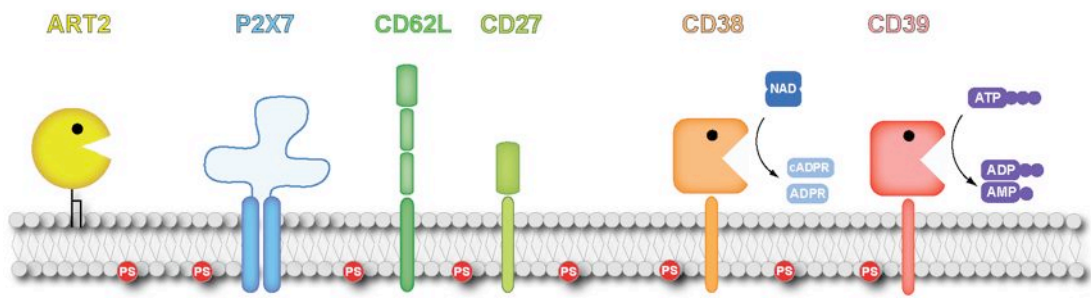
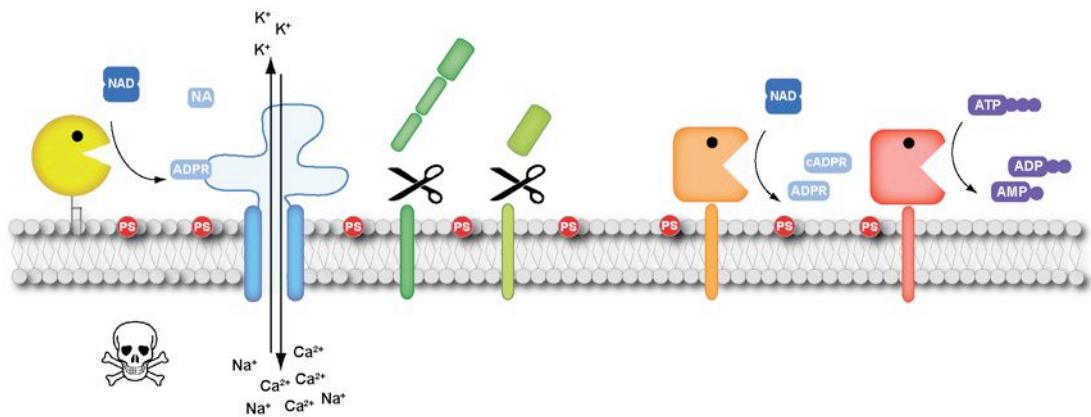
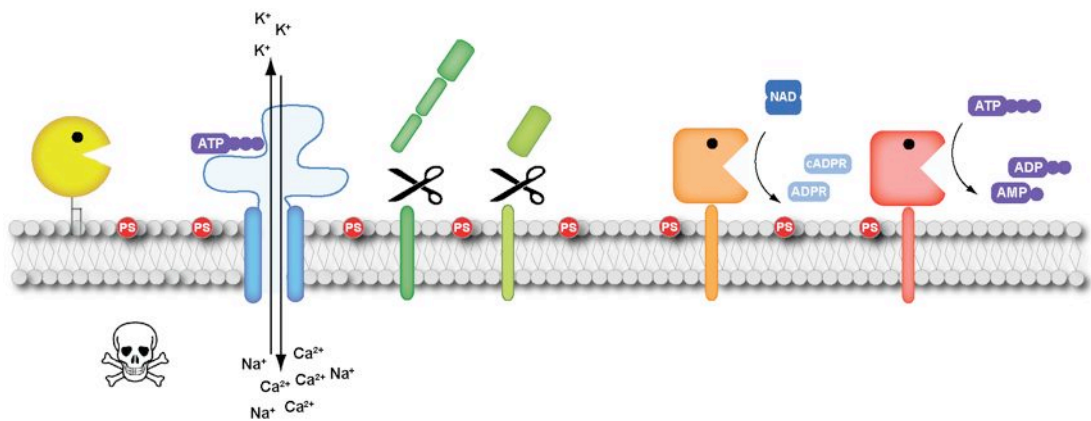
A**B****C**

Abb. 1.5 Aktivierung von P2X7 auf T Zellen durch extrazelluläres NAD und ATP

T Zellen exprimieren ecto-Enzyme auf der Zelloberfläche, mit denen sie extrazelluläre Nukleotide abbauen können. (A) Extrazelluläres NAD⁺ wird von CD38 zu ADP-Ribose (ADPR) oder zyklischer ADP-Ribose (cADPR) abgebaut. Extrazelluläres ATP wird über CD39 zu ADP oder AMP abgebaut. (B) NAD⁺ ist ebenfalls Substrat für die ADP-Ribosyltransferase 2 (ART2). Sie katalysiert die kovalente Verknüpfung der ADPR an Argininreste von Zielproteinen unter Freisetzung von Nikotinamid (NA). P2X7 ist ein Zielprotein von ART2 und kann durch ADP-Ribosylierung aktiviert werden. (C) Auch ATP kann P2X7 aktivieren. Die Folge der Aktivierung ist die Öffnung des Ionenkanals, der Einstrom von Ca²⁺ und Na⁺ Ionen sowie der Ausstrom von K⁺ Ionen. Konsequenz dieses Ionenflusses ist die Exposition von Phosphatidylserin (PS) und die Abspaltung von Zelloberflächenproteinen wie CD62L und CD27. Anhaltende Aktivierung von P2X7 führt zum apoptotischen Zelltod.

natürlich vorkommende Mutation im P2X7 Rezeptor Einfluss auf die ATP Sensitivität der T Zellen hat. So zeigten T Zellen von C57BL/6 Mäusen, welche die mutierte 451L Variante tragen, eine geringere Sensitivität gegenüber ATP als T Zellen aus Balb/c Mäusen, welche die natürliche 451P Variante des P2X7 Rezeptors tragen (Adriouch *et al.*, 2002). Für die NAD⁺ vermittelte Aktivierung von P2X7 sind weitaus geringere Konzentrationen nötig. Hierbei ist jedoch die Koexpression von P2X7 und ART2 zwingend notwendig (Seman *et al.*, 2003). Die ART2 vermittelte ADP-Ribosylierung des P2X7 Rezeptors erfolgt an Argininrest 125 und führt, ebenso wie die Aktivierung durch ATP, zur Öffnung des Ionenkanals (Schwarz *et al.*, 2009). Hierdurch kommt es zum Influx von Ca²⁺ und Na⁺ Ionen sowie zum Efflux von K⁺ Ionen. Als Konsequenz dieses Ionenflusses werden verschiedene zelluläre Prozesse aktiviert, deren Signalwege bislang nicht vollständig entschlüsselt sind (Di Virgilio *et al.*, 2001). So wird das unter naiven Bedingungen auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte Phosphatidylserin (PS) nach P2X7 Aktivierung auf der äußeren Seite der Plasmamembran präsentiert, ein Prozess der als *PS flashing* benannt wurde (Adriouch *et al.*, 2002; Courageot *et al.*, 2004). Verantwortlich dafür ist die durch den Ca²⁺ Einstrom bedingte Inaktivierung der Aminophospholipid-Transferase und der Scramblase (Bratton *et al.*, 1997; Stout *et al.*, 1997). *PS flashing* wird als ein Zeichen für ein frühes, aber zu diesem Zeitpunkt noch reversibles Stadium der Apoptose gesehen. Neben der Modifikation der Plasmamembran werden auch in dieser verankerte Proteine modifiziert. So wurde von Gu *et al.* 1998 beschrieben, dass L-Selektin (CD62L) durch ATP bedingte P2X7 Stimulation von der Zelloberfläche von T Lymphozyten abgespalten wird (Gu *et al.*, 1998), ein Prozess der als ecto-Domänen *shedding* oder kurz *shedding* bezeichnet wird. Als die dafür verantwortliche Metalloprotease wurde das TNF α -*converting enzyme* (TACE oder ADAM17) identifiziert (Li *et al.*, 2006). Neben CD62L werden noch andere Zelloberflächenprotein, wie CD27, durch P2X7 Aktivierung abgespalten (Moon *et al.*, 2006). *PS flashing* und *shedding* von Zelloberflächenproteinen erfolgen im Bezug auf die P2X7 Aktivierung sehr zeitnah. Hält die Aktivierung länger an, zeigen die T Zellen typische Zeichen des programmierten Zelltods. Hierzu zählen Caspaseaktivierung, Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials, DNA-Fragmentierung und die irreversible Aufnahme von DNA-bindenden Farbstoffen wie Propidiumiodid (Scheuplein *et al.*, 2003; Seman *et al.*, 2003). Die Induktion der Apoptose in T Zellen, durch extrazelluläre Nukleotide, bildet somit einen potentiellen regulatorischen Mechanismus in der T Zell Homöostase (Adriouch *et al.*, 2007).

1.3 Blockade von Enzymen durch *Nanobodies*

Im Jahr 1993 beschrieb die Gruppe um Raymond Hamers erstmals Antikörper aus Kamelseren, welche nur aus zwei schweren Ketten bestehen (Abb. 1.6A) (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Dieser Typ von Antikörpern existiert in allen Mitgliedern der *Camelidae* (Neuwelt- und Altweltkamele). Das Antigen erkennende Paratop wird bei diesen Antikörpern nicht durch Kombination der variablen Domäne der leichten (VL) und schweren

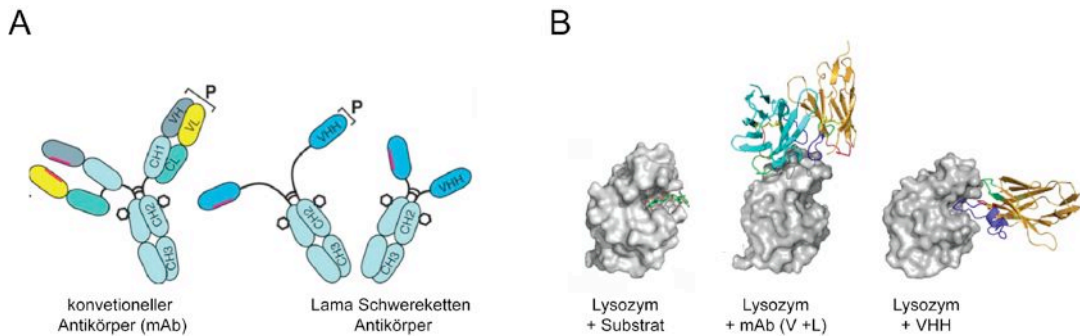


Abb. 1.6 Vergleich von konventionellen und Schwereketten Antikörpern.

(A) Konventionelle Antikörper bestehen aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten. Lama Schwereketten Antikörper bestehen nur aus zwei schweren Ketten. Aufgrund der fehlenden CH1 Domäne ist die VHH Domäne über eine lange oder kurze *hinge region* mit der CH2 Domäne verbunden. (B) Die VHH Dämme der Schwereketten Antikörper kann aufgrund ihrer fingerartigen CDR3 Region in molekulare Vertiefungen eindringen. In diesem Beispiel blockiert die VHH das aktive Zentrum von Lysozym und inhibiert dadurch dessen enzymatische Funktion (PDB-Code: 1MEL). Adaptiert aus Wesolowski *et al.* 2009.

(VH) Kette, wie bei den konventionellen Antikörpern gebildet, sondern einzig und alleine von der variablen Domäne der schweren Kette des Schwereketten Antikörpers (VHH). Mit 12-15 kDa Größe, bildet die VHH die kleinste Antigene bindenden Einheiten, was ihr im Rahmen der kommerziellen Nutzung den Namen „*Nanobody*“ einbrachte (Gibbs, 2005; Wolfson, 2006). Eine weitere Besonderheit der *Nanobodies* ist ihre sehr lange *complementary determining region 3* (CDR3) (Desmyter *et al.*, 1996). Anders als konventionelle Antikörper, welche einen eher planaren Bindungscharakter haben, können *Nanobodies*, aufgrund ihrer speziellen CDR3 Region, auch in molekularen Vertiefungen liegende Epitope erreichen, was sie zu idealen Blockern von Enzymen machen kann (Abb. 1.6B) (De Genst *et al.*, 2006). Weitere Eigenschaften der *Nanobodies* sind eine hohe Stabilität gegenüber Detergenzien, Temperatur und pH-Schwankungen. Infolge ihrer geringen Größe und globulären Struktur, zeigen sie nach Injektion eine gute und schnelle Biodistribution, werden daher aber auch schnell wieder über die Niere ausgeschieden (Wu and Senter, 2005; Saerens *et al.*, 2008).

1.3.1 Blockade der NAD vermittelten P2X7 Aktivierung durch ART2-spezifische *Nanobodies*

Um die über die ART2-P2X7 Achse vermittelten Effekte wie PS flashing und CD62L *shedding* zu blockieren, stehen eine Reihe von klassischen niedermolekulare Inhibitoren zur Verfügung. So blockiert 1-(N,O-bis[5-isoquinolinesulphonyl]-N-methyl-L-tyrosyl)-4-

phenylpiperazin (KN-62) die Aktivierung von P2X7 (Chessell *et al.*, 1998; Scheuplein *et al.*, 2009). ART2 als Arginin-spezifische mono-ADP-Ribosyltransferase kann durch Meta-Iodobenzylguanidin (MIBG) blockiert werden (Loesberg *et al.*, 1990; Koch-Nolte *et al.*, 1996). Die Schwächen dieser niedermolekularen Inhibitoren liegen in ihrer geringen Spezifität. So werden von MIBG neben ART2 noch weitere mono-ADP-Ribosyltransferasen inhibiert.

Um neue potente ART2-Inhibitoren zur Verfügung zu haben, generierten Koch-Nolte *et al.* 2007 mehrere ART2 spezifische *Nanobodies* (Koch-Nolte *et al.*, 2007). Dies erfolgte über die genetische Immunisierung eines Lamas mit einem ART2 exprimierenden Vektor, in Kombination mit mehreren ART2-Protein *booster* Immunisierungen im Abstand von 12 Wochen. Nach der letzten *booster* Immunisierung wurde aus dem Blut des Lamas periphere Blut Leukozyten gewonnen und deren RNA isoliert. Nach der reversen Transkription der RNA in cDNA wurde diese in den pHEN2 Phagemidvektor kloniert, um mittels *Phage Display* Technologie ART2-spezifische *Nanobodies* zu selektieren. Dabei wurden Klone gefunden, die nur an ART2 binden (Klon s-14) und Klone, die sowohl an ART2 binden, als auch deren katalytische Aktivität blockieren (Klon s+16a) (Koch-Nolte *et al.*, 2007). Werden T Zellen aus Mäusen *in vitro* mit s+16a inkubiert, so reagieren ähnlich wie T Zellen aus ART2ko Mäusen auf extrazelluläres NAD⁺ : Sie spalten kein CD62L mehr von der Zelloberfläche und externalisieren kein PS mehr auf ihrer Zelloberfläche. Neben der ART2 Blockade *in vitro*, konnte auch *in vivo* eine Blockade von ART2 durch die Injektion von s+16a nachgewiesen werden (Koch-Nolte *et al.*, 2007; Scheuplein *et al.*, 2010). Der ART2-spezifische Klon s+16a wurde im Rahmen dieser Arbeit mehrfach verwendet.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

T Zellen reagieren auf die im Rahmen von Entzündungsreaktionen freigesetzten Nukleotide NAD^+ und ATP. Als wichtige Sensoren für diese Gefahrensignale waren der P2X7 Ionenkanal sowie die NAD-metabolisierenden Ecto-Enzyme ART2 und CD38 identifiziert worden. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass NAD^+ bereits bei der Präparation von Zellen freigesetzt wird, dass T Zellen *in vivo* durch NAD-Injektionen beeinflusst werden können und dass T Zell Subpopulationen unterschiedlich sensitiv auf extrazellulären Nukleotide reagieren. Konventionelle T Helfer Zellen (Thelp) und regulatorische T Zellen (Tregs) bilden zwei wichtige Subpopulationen von CD4^+ T Zellen, die gegensätzliche Funktionen ausüben: Thelp fördern eine Immunantwort, Tregs unterdrücken sie. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Grundlagen für die unterschiedliche Sensitivität dieser beiden Zellpopulationen gegenüber extrazellulärem NAD^+ eruiert werden. Darüber hinaus sollte in einem Tumor-Modell untersucht werden, ob die unterschiedliche Sensitivität pharmakologisch genutzt werden könnte. Als Modellsysteme standen für diese Untersuchungen Mausstämme zur Verfügung, bei denen Tregs über die transgene Expression von GFP einfach identifiziert werden können und bei denen relevante Sensoren für NAD^+ vorhanden (WT) oder genetisch ausgeschaltet sind (P2X7ko, ART2ko, CD38ko). Als experimentelles Werkzeug stand ferner ein ART2-blockierender Nanobody zur Verfügung.

Zunächst sollte die Expression von P2X7, ART2 und CD38 vergleichend auf Thelp und Tregs durchflusszytometrisch analysiert werden. In Dosis-Wirkungsexperimenten sollte dann die Sensitivität dieser Zellen gegenüber NAD^+ und ATP vergleichend untersucht werden. Als *read-out* Systeme sollten dabei u.a. der P2X7-abhängige Calcium-Influx, die Externalisation von Phosphatidylserin, der Verlust von membranständigem CD27 und CD62L, die Zellvitalität sowie die Suppressor-Funktion untersucht werden. Ob Tregs vor dem Einfluss von NAD^+ durch Blockade der ART2-Aktivität geschützt werden können, sollte durch Injektion des ART2-blockierenden Nanobodies untersucht werden. Schließlich sollte analysiert werden, ob die Injektion von NAD^+ das Gleichgewicht von Tregs zu Effektor T Zellen (Teff) zugunsten der Teff verschieben und damit eine effektivere Tumor-Antwort ermöglichen kann.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mausstämme

Alle Mausstämme wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Eppendorf gezüchtet. Für die B16 Tumor Experimente wurden die C57BL/6 WT Tiere bei Harlan (Niederlande) bestellt und direkt an das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig geliefert.

Die C57BL/6 WT DEREГ Mäuse wurden von Tim Sparwasser zur Verfügung gestellt und mit den unten aufgeführten knockout-Mäusen (ko Mäuse) gekreuzt. Die DEREГ Maus exprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und dem Diphtherietoxinrezeptor unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors, so dass alle Foxp3 exprimierenden regulatorischen T Zellen (Tregs) über die grüne Fluoreszenz detektiert werden können (siehe Abb. 1.1). Ferner besteht die Möglichkeit, Tregs *in vivo* durch die Injektion von Diphtherietoxin gezielt zu depletieren (Lahl *et al.*, 2007).

Stamm: C57BL/6 (B6)

	<u>Referenz</u>
B6-WT	-
B6-CD38ko	(Cockayne <i>et al.</i> , 1998)
B6-ART2ko	(Ohlrogge <i>et al.</i> , 2002)
B6-P2X7ko	(Solle <i>et al.</i> , 2001)
B6-WT-DEREГ	(Lahl <i>et al.</i> , 2007)
B6-CD38ko-DEREГ	eigene Kreuzung
B6-ART2ko-DEREГ	eigene Kreuzung
B6-P2X7ko-DEREГ	eigene Kreuzung
PFPRAG-MM	(Banuelos <i>et al.</i> , 2004)

Stamm: Balb/c

Balbc-WT-DEREГ	eigene Kreuzung
Balbc-CD38ko-DEREГ	eigene Kreuzung
Balb/c-ART2ko-DEREГ	eigene Kreuzung
Balb/c-P2X7ko-DEREГ	eigene Kreuzung

Stamm: DBA/1

DBA/1-WT-DEREГ	eigene Kreuzung
----------------	-----------------

2.1.2 Laborgeräte

<u>Durchflusszytometer</u>	<u>Firma</u>
FACSCalibur	Becton Dickinson
FACSCantoII	Becton Dickinson
LSRII	Becton Dickinson
FACSAria	Becton Dickinson
<u>Mikroskope</u>	<u>Firma</u>
Axiovert25	Zeiss
<u>Zentrifugen</u>	<u>Firma</u>
Rotanta 460R	Hettich
Biofuge pico	Heraeus
TSpin	Promega
<u>Brutschrank</u>	<u>Firma</u>
inCu safe	Sanyo
<u>Sterile Werkbank</u>	<u>Firma</u>
Hera safe	Heraeus
<u>Laborkleingeräte</u>	<u>Firma</u>
Vortex Mixer	neoLab
Pipetboy	Integra
IR-Lampe	Philips
Roller	
Neubauerzählkammer	
<u>Pipetten</u>	<u>Firma</u>
Eppendorf Research 1000	Eppendorf
Eppendorf Research 200	Eppendorf
Eppendorf Research 100	Eppendorf
Eppendorf Research 20	Eppendorf
Eppendorf Research 10	Eppendorf
Eppendorf Research 300 Multikanal	Eppendorf

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Reagiergefäß 1,5 ml	Eppendorf
Reagiergefäß 2 ml	Eppendorf
Kulturschale 10 cm Nunclon	Nunc

96-Napf Mikrotiterplatte Format (U)	Nunc
96-Napf Mikrotiterplatte Format (F)	Nunc
96-Napf Mikrotiterplatte Format (V)	Greiner bio <i>one</i>
FACS Röhrechen Polystyrene	BD
Micro FACS Röhrechen	BD
Insulinspritze	BD
Serologische Pipette 25 ml	BD Falcon
Serologische Pipette 10 ml	BD Falcon
Serologische Pipette 5 ml	BD Falcon
Zellsieb 70 µM	Falcon
Centriprep10	Amicon
Entsorgungsbeutel	Brand
Spritze 10 ml	Braun
Spritze 5 ml	Braun
Falcon Röhrechen 50 ml	Greiner
Falcon Röhrechen 15 ml	Greiner
Stericup ExpressPlus 0,22 µM, 500 ml	Millipore
Stericup ExpressPlus 0,22 µM, 150 ml	Millipore
Pipettenspitzen blau 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen gelb 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen grau 10 µl	Sarstedt
Einmalhandschuhe Vibrant	Aurelia

2.1.4 Chemikalien

Fetales Kalberserum (FCS)	PAA
Normal Rattenserum	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	CalBiochem
PBS ^{-/-} ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco
PBS ^{+/+} mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco
RPMI 1640	Gibco
β-Mercaptoethanol	Gibco
L-Glutamin	Gibco
Hepes	Gibco
Natriumpyruvat	Gibco
Fluo4-AM	Invitrogen
Dynabeads M-280 sheep anti-mouse Ig	Invitrogen/Dynal
Nicotinamidadenindunukleotid (NAD ⁺)	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	Merck
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	J.T. Baker
Natriumchlorid (NaCl)	J.T Baker
ddH ₂ O	UKE (Millipore)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Serva
eFluor ⁶⁷⁰	eBioscience
DNase I	Roche
Collagenase/Dispase	Roche
Normal Rattenserum	PAA
LD nearIR	Invitrogen
LD aqua	Invitrogen
Fix/Perm Lösung, Diluent	eBioscience
Fix/Perm Lösung, Concentrate	eBioscience
Fix/Perm Puffer (10x)	eBioscience

2.1.5 Medien und selbst angesetzte Lösungen/Puffer

RPMI Medium (k=komplett), 1x

- RPMI 1640, 500 ml
- L-Glutamin, 10x 5 ml (1%)
- Hepes, 10x 5 ml (1%)
- Natriumpyruvat, 10x 5 ml (1%)
- β-Mercaptoethanol 0,1 mM
- Fetales Kälberserum, 50 ml

ACK Erythrozyten Lysepuffer (ACK Puffer), 1x

- NH₄Cl 155 mM (8,29 g)
- KHCO₃ 10 mM (1 g)
- EDTA 100 μM (0,037 g)
- ddH₂O (1L), auf pH 7,2 einstellen

AnnexinV Bindepuffer, 10x

- NaCl, 1,4 M (16,36 g)
- CaCl₂, 25 mM (0,555 g)
- HEPES, 0,1 M, auf pH 7,4 einstellen

Zellsuspensionspuffer, 1x

- PBS (-/-), 500 ml
- 0,2% BSA (1 g)

Tumordigestionslösung, 1x

Collagenase/Dispase (Stock: 100 mg/ml in H₂O)

DNase I (Stock: 10 mg/ml in H₂O)

Gebrauchslösung: 100 ml PBS + 200 µl Coll/Disp + 200 µl DNase I

Fixations & Permeabilisierungspuffer, 1x

Fix/Perm Lösung (eBioscience): 1 ml Concentrate + 3 ml Diluent (1x)

Fix/Perm Puffer (eBioscience, 10x): 1 ml Puffer + 9 ml H₂O (1x)

2.1.6 Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Klon</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Firma</u>
AnnexinV	-	APC	BD Bioscience
ART2	A106	Alexa ⁶⁴⁷	AG Koch-Nolte
CD3e	145-2C11	purified	AG Mittrücker
CD4	L3T4	V450	BD Bioscience
CD8	53-6-7	FITC	BD Bioscience
CD16/32	FCR-4G8	purified	BioXcell
CD25	PC61	APC	BD Bioscience
CD25	PC61	purified	BioXcell
CD27	LG.3A10	PE	eBioscience
CD38	90	PE	BioLegend
CD39	24DMS1	PE	eBioscience
CD44	IM7	PE	BD Bioscience
CD62L	MEL-14	perCP	Biolegend
Foxp3	FJK-16s	PE	eBioscience
Granzym B	GB12	PE	ABSerotech
P2X7	R23A44#16	Alexa ⁶⁴⁷	AG Koch-Nolte

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Tierexperimentelle Arbeiten wurden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Hamburg und am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Die Experimente wurden im Rahmen der örtlichen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Tierversuchsleiter waren Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte in Hamburg (Projekt G08/067, ORG-153) und Prof. Dr. Jochen Hühn in Braunschweig.

2.2.1.1. Injektion von Nanobodies zur *in vivo* ART2 Blockade

Die Injektion von ART2 blockierenden Nanobodies (s+16a) erfolgte intravenös (i.v.). Hierfür wurde die Maus zunächst für 3-5min unter einer Infrarotlampe erwärmt, so dass sich die Gefäße weiten. Anschließend wurden 100 µg s+16a in 200 µl PBS gelöst, in eine 1 ml Insulinspritze aufgezogen und in die Schwanzvene injiziert. Die Maus wurde 30 min nach der s+16a Injektion getötet und anschließend Milz und Lymphknoten präpariert.

2.2.1.2 Injektion von anti-CD25 Antikörpern (PC61) zur *in vivo* Treg Depletion

Für die *in vivo* Depletion von Tregs wurden 250 µg PC61 in 200 µl PBS gelöst, in eine 1 ml Insulinspritze aufgezogen und intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Drei Tage später wurden erneut 250 µg PC61 in 200 µl PBS gelöst und i.v. appliziert.

2.2.1.3 Injektion von NAD⁺

Für die *in vivo* Depletion von Tregs wurden B6-WT Mäuse je 50 mg NAD i.v. oder i.p. verabreicht, B6-CD38ko Mäuse bekamen 10 mg NAD⁺ i.v. oder i.p. gespritzt. Die entsprechende Menge NAD⁺ wurde in 200 µl PBS gelöst, der pH Wert mittels pH-Indikatorpapier überprüft, mit 3 M NaOH auf ca. pH 7,5 eingestellt und für die Injektion in eine 1 ml Insulinspritze aufgezogen. Die NAD⁺ behandelten Mäuse wurden 4 und 8 Stunden nach der Injektion beobachtet.

2.2.1.4 Implantation von B16 Tumorzellen

Die Mäuse wurden mit einer Isofluran-Kurzarkose betäubt und mit einem Tierhaarschneider wurde die rechte Flanke rasiert. Konfluent gewachsene B16 Tumorzellen aus einer T225 Zellkulturflasche wurden trypsiniert, mit RPMI Medium (k) gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf 2×10^6 Zellen / ml eingestellt. Für die Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse wieder in eine Isofluran Kurzarkose gelegt und 2×10^5 Zellen wurden in 100 µl PBS subkutan (s.c.) in die rechte Flanke injiziert.

2.2.1.5 Messung des Wachstums von B16 Tumoren

Das Wachstum der Tumoren wurde an den Versuchstagen 6, 10, 16, 20 und 23 untersucht. Mit Hilfe eines Messschiebers wurde die Länge, Breite und Höhe der Tumoren gemessen. Aus diesen Daten wurde der mittlere Tumordurchmesser ermittelt. Tiere deren Tumor einen mittleren Durchmesser von > 1 cm hatte, mussten getötet werden.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von primären Lymphozyten aus Lymphknoten

Für die Lymphknotenpräparation wurden die Mäuse narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Von den peripheren Lymphknoten wurden die inguinalen, cervicalen, axillären und brachialen Lymphknoten präpariert. Die Regionen, in denen sich Lymphknoten befinden, sind in Abb. 2.1 gekennzeichnet. Die Lymphknoten wurden mit einer Rundpinzette aus dem Gewebeverband gezogen und in einem 15 ml Falcon Röhrchen mit 5 ml PBS 0.2% BSA gesammelt. Anschließend wurde eine 5 ml Petrischale auf eine durch Eis gekühlte Metallplatte gestellt und in die Petrischale ein 70 μ M Zellsieb in das die Lymphknoten mit dem PBS hineingegeben wurden. Die einzelnen Lymphknoten wurden einmal angeschnitten und anschließend mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch das Zellsieb gerieben. Die Zellsuspension wurde nun in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt, bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in 1 ml PBS 0.2% BSA resuspendiert.

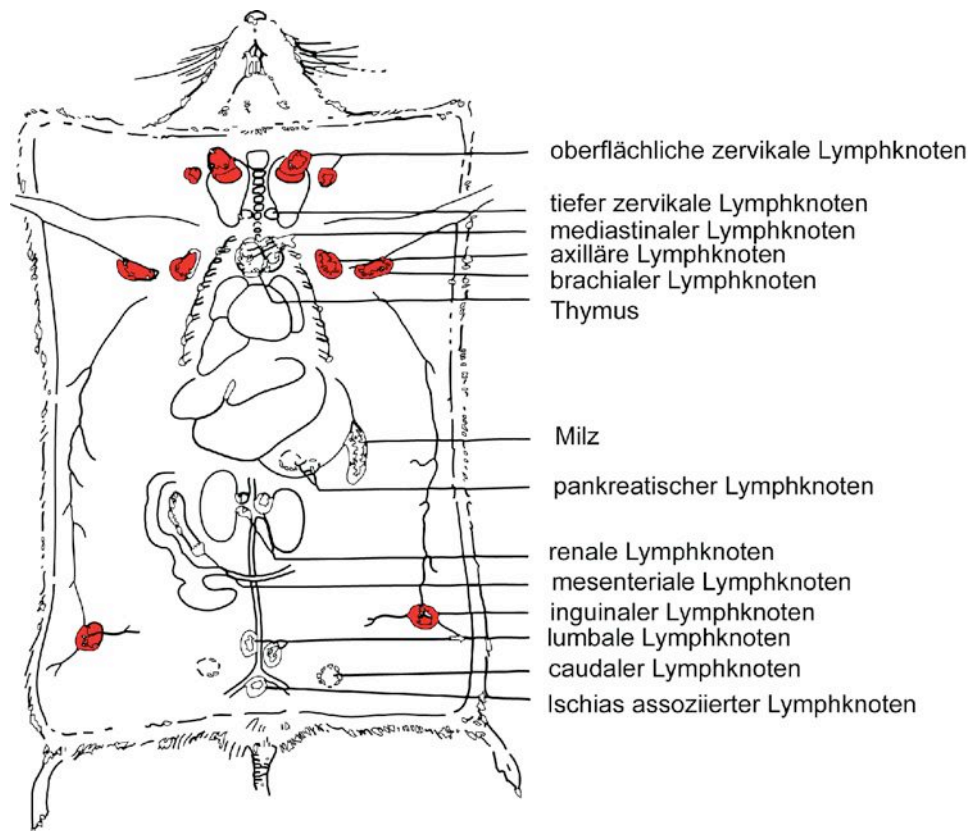


Abb 2.1 Die lymphatischen Organe der Maus.

Rot markiert sind die bei der Präparation isolierten Lymphknoten
(Quelle: www.jax.org, modifiziert)

2.2.2.1 Präparation von primären Lymphozyten aus der Milz

Durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen wurde die Milz entnommen und in ein 50 ml Falcon mit 10 ml PBS 0.2% BSA geben. Anschließend wurde eine 10 cm Petrischale auf eine durch Eis gekühlte Metallplatte gestellt und in die Petrischale ein 70 µM Zellsieb oder wahlweise ein Metallsieb gelegt, in das dann die Milz mit dem PBS überführt wurde. Zuerst wurde die Milz mit einer Schere mehrfach eingeschnitten, um sie anschließend mit dem Stempel einer 3 ml Spritze durch das Zellsieb zu reiben. Die Zellsuspension wurde danach in ein 15 ml Falcon Tube überführt, bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in 10 ml ACK-Erythrozytenlysepuffer (ACK-Puffer) resuspendiert. Die Dauer der ACK-Lyse betrug 5 min auf Eis, anschließend wurde die Zellsuspension bei 1600 rpm und 4 °C für 5min zentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit 10 ml PBS^{-/-} 0.2% BSA gewaschen, bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und abschließend in 5 ml PBS 0.2% BSA resuspendiert.

2.2.2.2 Präparation von primärem Lymphozyten aus Blut

Für die Blutentnahme an lebenden Mäusen wurden die Tiere mit Isofluran in eine kurze Narkose gelegt, anschließend wurde mit einer Kapillare retrobulbär Blut entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Heparin überführt und gut gemischt. Wenn die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden sollten, wurden sie zuerst für 20min mit einem Antikörpermix inkubiert. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse mit BD FACS Lysing Solution durchgeführt. Die FACS Lysing Solution wurde 1:10 mit H₂O verdünnt und 1 ml dieser verdünnten Lösung wurde auf 50 µl Blut gegeben. Nach 2-3 min wurde die Lysereaktion durch Zugabe von PBS gestoppt und die Zellen wurden einmal mit PBS 0.2% BSA gewaschen und anschließend in 100 µl PBS 0.2% BSA resuspendiert.

2.2.2.3 Präparation von primären Lymphozyten aus B16 Tumorgewebe

Der subkutane B16 Tumor wurde frei präpariert und in eine 5 cm Petrischale (auf Eis) überführt. Anschließend wurde der Tumor mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerschnitten und mit 1 ml einer Digestionslösung aus Collagnase, Dispase und DNaseI inkubiert. Die Lösung mit den Tumorstückchen wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und die Petrischale wurde nochmals mit 5-10 ml Digestionslösung gespült und ebenfalls in das Falcon Röhrchen überführt. Das Ganze wurde für 30 min bei 37 °C im Brutschrank auf einem Rotor inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung über einen 100 µM Cell Strainer in ein 50 ml Falcon Röhrchen gegeben und mit 20 ml einer PBS 5 mM EDTA Lösung abgestoppt. Die Suspension wurde anschließend bei 1600rpm und 4 °C für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml ACK-Lyse-Puffer resuspendiert und für 2-3 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 15 ml PBS 0.2% BSA gewaschen. Für die Trennung von Lymphozyten und Tumorzellen wurde ein Percoll-Gradient verwendet. Hierbei wurde die gewaschenen Zellen in einer 40% Percoll-Lösung resuspendiert. Die Percoll/Zellsuspension wurde dann in einem 15 ml Falcon Tube über eine 70% Percoll-Lösung geschichtet und für 20 min bei 1600 rpm und Raumtemperatur mit ausgeschalteter

Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit einer 1 ml Pipette vorsichtig abgenommen und anschließend 2x mit PBS 0.2% BSA gewaschen. Die Zellen wurden abschließend in 500 µl PBS 0.2% BSA resuspendiert und auf Eis gelagert.

2.2.2.4 Depletion von B-Zellen aus einer heterogenen Zellsuspension

Um B-Zellen aus einer Milz- oder Lymphknotenzellsuspension zu depletieren wurde ein Kit der Firma Invitrogen verwendet (Dynabeads M-280 sheep anti-mouse Ig). An magnetische Polystyrene-Kügelchen (Dynabeads) gekoppelte Schaf-anti-Maus-Immunglobulin Antikörper (polyklonal) binden B-Zellen in einer Zellsuspension über ihren B-Zell Rezeptor. Für die B-Zelldepletion wurden die Zellen in 1 ml RPMI Medium (k) resuspendiert. Es wurden 100 µl der Dynabeads-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und in einen Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde verworfen und die Dynabeads wurden 2x mit 1 ml RPMI Medium (k) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Dynabeads wurden mit der 1 ml Zellsuspension vermischt und für 20 min bei 4 °C auf dem Roller inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß in den Magnetständer gestellt und die Dynabeads sowie die daran gebundenen B-Zellen wurden aus der Zellsuspension entfernt. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei 4 °C gelagert.

2.2.2.5 NAD/ATP *in vitro* Inkubationsversuche

Um den Effekt von NAD und ATP auf CD4⁺ T Zellen zu untersuchen wurden Milzzellen nach der Präparation in 5 ml RPMI(k) resuspendiert und 100 µl Aliquots in Näpfe einer 96-Napf Mikrotiterplatte Platte pipettiert. Zu der Zellsuspension wurden dann 100 µl einer NAD- oder ATP-Lösung gegeben, das Ganze wurde gemischt und anschließend für 15min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Inkubationsende wurde die 96-Napf Mikrotiterplatte kurz auf Eis abgestellt und die Zellen wurden bei 1600 rpm und 4 °C für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet 2x mit PBS 0.2% BSA gewaschen und in 100 µl PBS 0.2% BSA resuspendiert. In Dosis-Wirkungsanalysen wurden Konzentrationen von 1-100 µM NAD und 8-500 µM ATP eingesetzt. In Kinetikexperimenten betrug die NAD⁺ Konzentration 30 µM und die ATP Konzentration 300 µM. Die Zellen wurden hierbei bis zu 30 min bei 37 °C inkubiert, Proben wurden nach 1, 2, 3, 4, 5 und 30min entnommen.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Das erste fluoreszenzbasierte Durchflusszytometer wurde 1968 von Wolfgang Göhde an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster entwickelt. Es ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in einer großen Zellmenge anhand der Detektion von Zelloberflächenproteinen durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper (Übersichtsartikel (Herzenberg *et al.*, 2002; Givan, 2011)). Die Zellen werden über eine Kapillare durch einen Laserstrahl geleitet. Dabei wird das Fluorochrom angeregt und emittiert daraufhin Licht bei einer für das Fluorochrom spezifischen Wellenlänge. Mehrere Fluorochrome lassen sich mit dem gleichen Laser anregen, unterscheiden sich aber in ihrem Emissionsspektrum. So können über einen Festkörperlaser (blau, 488 nm) die Fluorochrome Fluorescein-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) gleichzeitig angeregt werden. Der Emissionsspitze von FITC liegt bei 525 nm, die von PE bei 575 nm. Beide Signale können über einen 560SP dichroitischen Spiegel voneinander getrennt werden: die Wellenlänge des von FITC emittierten Signals ist kürzer als 560 nm, durchdringt den Filter und wird anschließend im grünen Fluoreszenzkanal detektiert. Die Wellenlänge des von PE emittierten Signals ist jedoch länger als 560 nm, wird vom dichroiden Spiegel reflektiert und im gelben Fluoreszenzkanal detektiert. Exemplarisch verdeutlichen lässt sich dieses Prinzip gut an der Differenzierung von T Helferzellen und zytotoxischen T Zellen. Erstere exprimieren das Zelloberflächenmolekül CD4, letztere exprimieren CD8. In einer heterogenen Zellsuspension können beide durch die Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-CD4 und einem PE-konjugierten anti-CD8 Antikörper unterschieden werden.

Moderne Durchflusszytometer, wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendetet FACSCantoII oder das LSRII von Becton Dickinson sind mit mehreren Lasern sowie einer Vielzahl von Filtern ausgestattet und ermöglichen so die parallele Detektion von 8 (FACSCantoII) bzw. 13 (LSRII) verschiedenen Fluorochromen (Tab 2.1) in einer einzigen Probe (Telford, 2011; Ibrahim and van den Engh, 2007). Neben der Markierung von Zelloberflächenmolekülen können durch Zellfixierung und Permeabilisierung auch intrazelluläre Proteine, wie Transkriptionsfaktoren oder Zytokine markiert werden (Arora, 2002; Lovelace and Maecker, 2011). Ferner bieten Durchflusszytometer wie das FACS Aria die Möglichkeit, Zellen zu sortieren. Hierbei werden die Zellen ebenfalls durchflusszytometrisch charakterisiert und anschließend über eine Kapillare einzeln in winzige Flüssigkeitstropfen verpackt. Diese Tropfen können dann elektrostatisch abgelenkt und in Reagenzgefäßen aufgefangen werden. Auf diese Weise können bis zu vier verschiedene Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellsuspension isoliert werden (Ibrahim and van den Engh, 2007).

2.2.3.2 Strategien zur Charakterisierung von Zellpopulation (*gating* Strategien)

Einer der Vorteile von durchflusszytometrischen Messungen ist die Möglichkeit, eine bestimmte Zellpopulation aus einer heterogenen Zellmasse zu untersuchen. Um die Analyse auf diese bestimmte Zellpopulation zu beschränken, bedarf es einer sogenannten *gating*

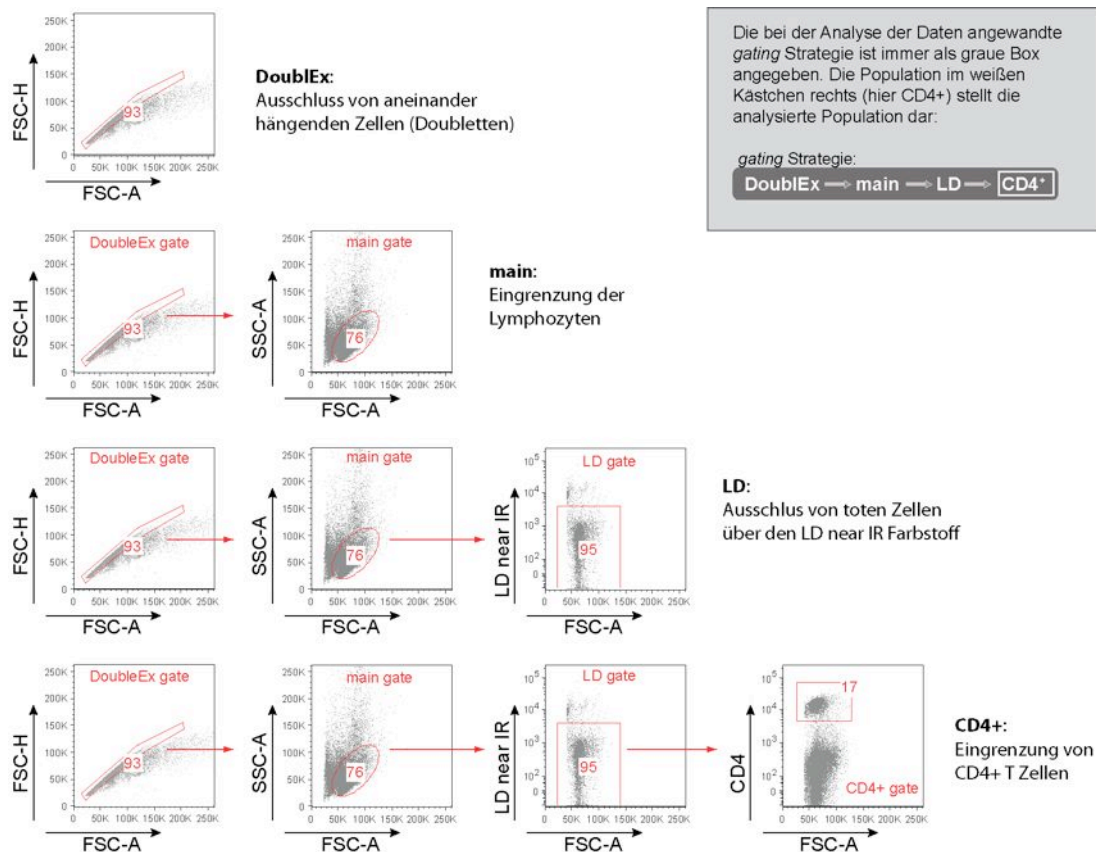


Abb 2.2 gating Strategien zur Analyse von Zellpopulation in der Durchflusszytometrie.

Die Charakterisierung von Zellen erfolgt anhand einer bestimmten *gating* Strategie. Dabei werden zunächst aneinanderhängende Zellen (Doubletten) ausgeschlossen (DoubleEx). Anschließend wird die zu untersuchende Zellpopulation eingrenzt (*main*). Danach werden toten Zellen durch einen lebend/tot Farbstoff (LDnearIR) von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Schließlich kann die Zellpopulation durch Fluorochromkonjugierte Antikörper identifiziert werden. Aus diesen sukzessiven Schritten ergibt sich die *gating* Strategie (graue Box).

Strategie, um unspezifische Signale auf ein Minimum zu reduzieren. Dabei spielen neben der Charakterisierung über Fluorochrom-konjugierte Antikörper noch zwei weitere Messparameter eine wichtige Rolle: der *forward scatter* (FSC) und der *side scatter* (SSC). Der FSC erlaubt Rückschlüsse auf die Zellgröße. So haben große Zellen einen hohen FSC Wert, kleine entsprechend einen niedrigen FSC Wert. Der SSC erlaubt Rückschlüsse über die Granularität der Zellen: je granulärer die Zellen desto höher der SSC Wert. Anhand dieser beiden Werte, Größe und Granularität, ist es bereits möglich, bestimmte Zellpopulationen zu charakterisieren. Auf diese Weise können zum Beispiel die großen und granulären Makrophagen von den kleineren und agranulären Lymphozyten abgegrenzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente beschränken sich auf die Untersuchung von Lymphozyten. In Abb. 2.2 ist dargestellt, wie die Charakterisierung von CD4⁺ T Zellen in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Zunächst wurden anhand der Parameter FSC-A und FSC-H Einzelzellen identifiziert. Diese liegen bei der FSC-A/FSC-H Analyse auf einer Diagonalen (*DoubleEx gate*). Zusammenhängende Zellen (Doubletten) wurden so von der weiteren Analyse ausgeschlossen. In einem weiteren Schritt wurde in der Analyse von FSC-A/SSC-A die Hauptlymphozytenpopulation identifiziert (*main gate*). Um tote Zellen von der

Analyse auszuschließen, wurde der lebend/tot Farbstoff LDnearIR verwendet. Nur tote Zellen sind permeabel für diesen Farbstoff. Dieser bindet nicht-selektiv an intrazelluläre Proteine und markiert die toten Zellen mit einem starken Fluoreszenzsignal. Diese Zellen wurden dann von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Abschließend wurden die CD4⁺ T Zellen durch einen Fluorochrom-konjugierten anti-CD4 Antikörper identifiziert. Alle aufgeführten *gates* bilden in ihrer Abfolge die sogenannte *gating* Strategie.

Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse von Experimenten, welche auf einer durchflusszytometrischen Analyse beruhen, enthalten eine kleine graue Box, in der die *gating* Strategie für dieses Experiment explizit erläutert wird.

2.2.3.3 Anfärbung von Zelloberflächenproteinen auf Leukozyten

Für die Markierung von Zelloberflächenproteinen wurden aus Milz, Lymphknoten oder Tumorgewebe isolierte Leukozyten in Micro FACS Röhrchen überführt und bei 1600rpm, 4 °C, für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 50 µl Zellsuspensionspuffer + 1 µl Fc-Block (anti CD16/32) + 1 µl Normal Rattenserum resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zweck dieses Schritts ist die Reduzierung der unspezifischen Bindungen durch die Blockade der Fc-Rezeptoren. Anschließend wurden 50 µl eines Antikörpermix hinzupipettiert. Der Antikörpermix bestand aus 50 µl Zellsuspensionspuffer + 1 µl je Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis im Dunkeln wurde die Zellsuspension mit 400 µl Zellsuspensionspuffer aufgefüllt und bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen ein zweites Mal gewaschen und abschließend in 100-200 µl Zellsuspensionspuffer resuspendiert.

2.2.3.4 Anfärbung von intrazellulären Proteinen in Leukozyten

Vor der Anfärbung von intrazellulären Proteinen erfolgte erst die Markierung der Zelloberflächenproteine wie unter 2.2.3.3 beschrieben. Die Zellen wurden danach mit 400 µl PBS gewaschen, in 200 µl Fix/Perm Lösung (1x) resuspendiert und mindestens 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Wahlweise wurde die Inkubationsdauer über Nacht ausgedehnt. Nach diesem Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt wurden die Zellen mit 400 µl Fix/Perm Puffer aufgefüllt und bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nochmals mit 400 µl Fix/Perm Puffer gewaschen. Der Überstand wurde nochmals abgenommen, die Zellen in 50 µl Fix/Perm Puffer + 1 µl Fc-Block + 1 µl Normal Rattenserum resuspendiert und bei 4 °C auf Eis inkubiert. Nach 10 min wurde der Antikörpermix hinzugegeben. Dieser bestand aus 50 µl Fix/Perm Puffer + 1 µl je Antikörper. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Röhrchen mit den Zellen mit 400 µl Fix/Perm Puffer aufgefüllt und dann bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und abschließend in 100-200 µl Zellsuspensionspuffer resuspendiert.

2.2.3.5 Echtzeit-Durchflusszytometrie

Die Aktivierung von P2X7 hat den Einstrom von Calcium Ionen in die Zelle sowie das Abspalten von Zelloberflächenmolekülen wie CD62L zur Folge. Die Öffnung des Ionenkanals erfolgt aber nur bei Temperaturen um 37 °C. Um den Calcium Influx bei CD4⁺ T Zellen im zeitlichen Zusammenhang zu verfolgen, wurden Milzzellen präpariert und 500 µl der Milzzellsuspension wurden mit 10 µM Fluo4-AM sowie je 5 µl anti-CD4-V450, anti-CD25-APC und anti-CD62L-PerCP Antikörpern für 30min bei 4 °C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, in 600 µl calciumhaltigen PBS ⁺⁺ + 0,2% BSA resuspendiert, in ein FACS Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Daraufhin wurden für die Stimulation von P2X7 30 µM NAD oder 300 µM ATP hinzugegeben. Danach wurde das FACS Röhrchen mit den Zellen zur Messung in das Durchflusszytometer eingeführt (FACSCantoII). Um die Temperatur kontinuierlich auf 37 °C zu erhöhen, wurde das FACS Röhrchen mit einer IR-Lampe in einem Abstand von 30-40 cm bestrahlt. Die Temperatur wurde dabei in einem mit 600 µl PBS gefüllten FACS Röhrchen, welches mittels eines Stativs in unmittelbarer Nähe des zu messenden FACS Röhrchens angebracht war, mit einem Thermometer gemessen (Abb. 2.3). Es erfolgte zudem die minütliche Protokollierung der Temperatur von Messungsbeginn an, um später eine Temperaturkurve in Abhängigkeit von der Zeit erstellen zu können. Am Durchflusszytometer wurde dann zeitgleich über einen Zeitraum von 20 min das Calciumsignal sowie der Verlust von CD62L von der Zelloberfläche auf Tregs (CD4⁺CD25⁺) und Thelp (CD4⁺CD25⁻) gemessen.

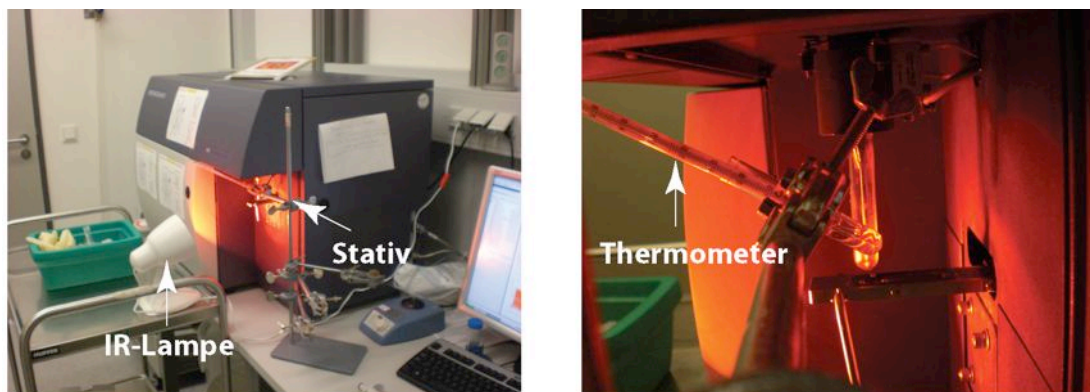


Abb 2.3 Experimenteller Aufbau für die Echtzeit-Durchflusszytometrie.

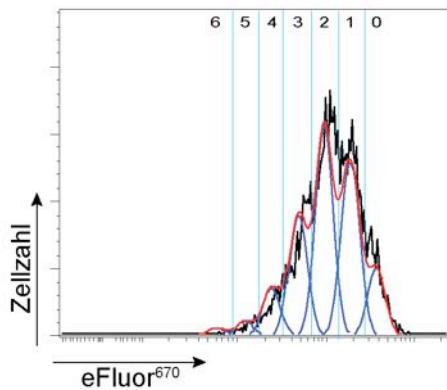
Um den Calcium Influx und die Abspaltung von CD62L während einer 37 °C Inkubation in Echtzeit untersuchen zu können wird vor dem FACSCantoII eine Infrarotlampe aufgestellt. Diese wird auf den SIT gerichtet und erwärmt das FACS Röhrchen während der Messung. Dabei wird die Temperatur in einem separaten mit PBS gefüllten FACS Röhrchen mit einem Termometer gemessen.

2.2.3.6 *In vitro* T Zell Suppressionsversuch

Die immunsuppressiven Eigenschaften von Tregs können *in vitro* im T-Zell Suppressionsversuch analysiert werden (siehe 1.1.3.3). Für diesen Versuch wurden Milz- und Lymphknotenzellen von drei C57BL/6 DEREK Mäusen präpariert und vereinigt.

Anschließend wurden die B Zellen aus der heterogenen Zellsuspension mit Hilfe von anti-Maus-Ig Dynabeads depletiert (siehe 2.2.2.4). Mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung wurden dann die GFP⁻ Effektor T Zellen (Teff) von den GFP⁺ Tregs getrennt. Dabei wurden soviel Tregs wie möglich isoliert. Von den Teff wurden 2 x 10⁶ Zellen isoliert. Da die Proliferation dieser Zellen im T Zell Suppressionsversuch ein Maß für die Suppressoraktivität der Tregs ist, werden die zur Proliferation angeregten Teff in diesem Experiment *responder* T Zellen (Tresp) genannt. Beide Zellpopulationen wurden in 15 ml Falcon Röhrchen mit RPMI Medium (k) aufgefangen und anschließend bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Tresp anschließend in 1 ml PBS ohne BSA resuspendiert. Die Tregs hingegen wurden in 500 µl RPMI Medium (k) resuspendiert. Die Tresp wurden mit 5 µM des fluoreszenten Farbstoffs eFluor⁶⁷⁰ für 3 min bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurde das 15 ml Falcon Röhrchen mit 10 ml RPMI Medium (k) aufgefüllt und bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Tresp nochmals mit 10ml RPMI Medium (k) gewaschen und abschließend in 1 ml RPMI Medium (k) resuspendiert. Die Zellzahl der Tregs und Tresp wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt und auf 1 x 10⁶ eingestellt. Dann wurden 50.000 Tresp in einem Volumen von 50 µl zusammen mit einer abnehmenden Anzahl von Tregs (50.000, 33.000, 25.000, 12.500, 6250, ohne Tregs) in den Napf einer 96-Napf Mikrotiterplatte (U oder F) pipettiert. Bei 50.000 Tregs betrug das Volumen dabei 50 µl. Wurden weniger Tregs eingesetzt, so wurde die Volumendifferenz mit RPMI Medium (k) ausgeglichen. Neben den T Zellen wurden noch 2 x 10⁵ *feeder* Zellen in einem Volumen von 50 µl in den Napf gegeben. Diese Zellen stammten aus der Milz einer PFPRAG-MM Maus und dienen als antigenpräsentierende Zellen. Die PFPRAG-MM Maus hat keine funktionellen T-, B- oder NK-Zellen. Die Leukozyten in der Milz dieser Maus setzen sich somit zum größten Teil aus Zellen mit antigenpräsentierender Funktion zusammen. Abschließend wurden zur Stimulation der T Zellen noch 50 µl RPMI Medium (k) + anti-CD3 (400 ng/ml) in den Napf gegeben, so dass das Gesamtvolumen 200 µl und die finale anti-CD3 Konzentration 100 ng/ml betrug. Die Zellen wurden für 72 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in Micro FASCS Röhrchen überführt, diese mit 400 µl Zellsuspensionspuffer aufgefüllt und bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden der Überstand verworfen und die Zellen mit anti-CD4 angefärbt (siehe 2.2.3.3). Die Proliferation der CD4⁺ Tresp wurde am Durchflusszytometer über die Ausdünnung von eFluor⁶⁷⁰ gemessen. Die quantitative Analyse der Proliferation erfolgte durch die FlowJo Software (Treestar). Dabei wurden zwei Parameter berechnet: der prozentualen Anteil sich teilender Zellen und der Teilungsindex (Abb. 2.4B). Eine detaillierte Berechnung dieser beiden Parameter ist in Abb. 2.4A dargestellt. Der Parameter „% sich teilende Zellen“ bezieht sich auf die ursprünglichen Anzahl untersuchter Zellen. Da sich diese mit jeder Teilung verdoppelt, wird die Zellzahl jeder Generation durch die Menge an entstandenen Tochterzellen dividiert. Diese Werte werden addiert und die Zellzahl von Generation 0 wird subtrahiert. Dadurch erhält man die

A



Generation	A	B	C	D
0	783	1	783	0
1	1989	2	994,5	994,5
2	2411	4	602,75	1205,5
3	1386	8	173,25	519,75
4	554	16	34,625	138,5
5	175	32	5,469	27,345
6	102	64	1,594	9,564

Ursprünglichen Zellen: 2595,188
 Summe: 2895,159

Generation 0=ungeteilt, 1=eine Teilung usw.
 A = gemessene Anzahl von Zellen in der Generation (Zellzahl)
 B = $2^{\text{Generation}}$ (Anzahl der Zellen die seit der ersten Teilung entstanden sind)
 C = A / B
 D = Generation x Zellzahl

% sich teilende Zellen:
 Absolute Anzahl aller Zellen in Teilung:
 $2595,188 - 783 = 1812,188$
 Prozentualer Anteil aller Zellen in Teilung:
 $1812,188 / 2595,188 = 69,8\%$

Teilungsindex:
 Durchschnittliche Anzahl an Teilungen aller Zellen:
 $2895,159 / 2595,188 = 1,115$

B

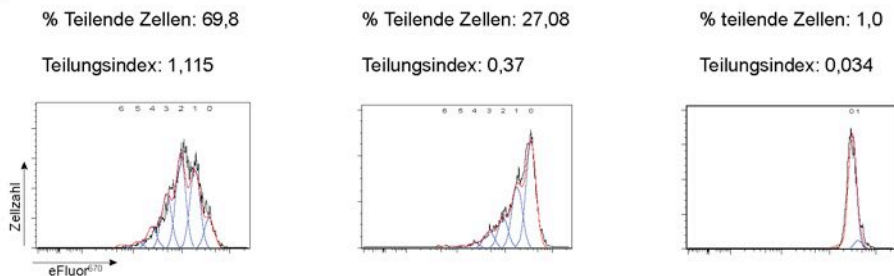


Abb 2.4 Berechnung der Parameter „% sich teilende Zellen“ und des „Teilungsindex“

Die Berechnung des relativen Anteils sich teilender Zellen und des Teilungsindex wurde für die Experimente dieser Arbeit mit der FlowJo Analyse Software durchgeführt und wird in (A) detailliert erläutert. (B) Auf diese Weise kann die Suppression der Proliferation Tresp durch die Tregs unter verschiedenen Bedingungen quantifiziert werden.

absolute Anzahl an Zellen, welche mindestens eine Teilung durchlaufen haben. Diese kann in Relation zu allen ursprünglichen Zellen gesetzt werden und man erhält den Parameter „% sich teilende Zellen“. Der „Teilungsindex“ ist der Mittelwert für die Anzahl an Teilungen bezogen auf alle Zellen. Er berechnet sich dadurch, dass man die Zellzahl in einer Generation mit der laufenden Nummer der Generation selbst multipliziert und anschließend für alle Generationen die Summe dieser Werte bildet. Dieser Wert wird dann durch die Anzahl an ursprünglichen Zellen dividiert und liefert den Teilungsindex.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Unterkapitel. Im ersten Unterkapitel werden T Helferzellen (Thelp) und regulatorische T Zellen (Tregs) aus C57BL/6 Mäusen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber extrazellulärem NAD⁺ und ATP untersucht. Dabei wird zunächst die Expression der wichtigsten Zelloberflächenmoleküle, welche NAD und ATP als Liganden oder Substrat haben (P2X7, ART2, CD38), analysiert. Daraufhin werden Reaktionen von Tregs und Thelp auf Behandlung mit exogenem NAD⁺ und ATP vergleichend untersucht. Als Detektionssysteme dienen dabei der P2X7-abhängige Calcium Influx, die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) an der Zellmembran, sowie der Verlust (*shedding*) von CD27 und CD62L von der Zelloberfläche. Die Ergebnisse zeigen, dass Tregs aus C57BL/6 Mäusen auf NAD⁺ Mengen im einstelligen mikromolaren Bereich reagieren. Dies wirft die Frage auf, ob bei der Zellpräparation freigesetztes NAD⁺ Tregs beeinflussen könnte.

Die Untersuchungen des zweiten Unterkapitels zeigen, dass NAD⁺ in der Tat bei der Zellpräparation in Mengen freigesetzt wird, die ausreichen, die Funktion der präparierten Tregs *in vitro* nachhaltig zu beeinflussen. Verhindert werden kann dieser unerwünschte Wirkung von NAD⁺ auf frisch präparierte Tregs durch eine intravenöse Gabe von ART2-blockierenden Nanobodies vor der Präparation.

Im Umkehrschluss stellte sich die Frage, ob die hohe NAD⁺ Sensitivität der Tregs eine Möglichkeit bietet, Tregs *in vivo* durch die Injektion von NAD⁺ zu manipulieren. Die im dritten Unterkapitel dargestellten Untersuchungen zeigen, dass die Injektion von NAD⁺ in der Tat die Balance zwischen Tregs und Effektor T Zellen (Teff) zugunsten der Teff verschieben kann. Das Kapitel schließt mit Untersuchungen über eine mögliche therapeutische Anwendung dieses NAD-Effekts in einem murinen Tumormodell.

3.1 Vergleichende Analyse von Tregs und Thelp bezüglich ihrer

Empfindlichkeit gegenüber extrazellulären Nukleotiden

CD4⁺ T Zellen reagieren auf NAD⁺ und ATP (Scheuplein *et al.*, 2009). Grund hierfür ist die Aktivierung von P2X7 auf CD4⁺ T Zellen durch die Bindung von ATP oder ART2-vermittelte, kovalente Übertragung einer ADP-Ribose-Gruppe von NAD⁺ auf einen Argininrest des P2X7 Rezeptors. Eine differenzielle Analyse soll Erkenntnisse darüber liefern, ob Subpopulationen der CD4⁺ T Zellen unterschiedlich stark auf NAD⁺ und ATP reagieren. Regulatorische T Zellen (Tregs) bilden mit ca. 10% aller CD4⁺ T Zellen neben den T Helferzellen (Thelp) die zweitgrößte Subpopulation innerhalb der CD4⁺ T Zellpopulation in lymphatischen Organen. Beide Zellpopulationen werden im folgenden Kapitel bezüglich der Expression relevanter Zelloberflächenproteine und bezüglich der Sensitivität gegenüber NAD⁺ und ATP *in vitro* vergleichend analysiert.

3.1.1 In DEREГ Mäusen können Tregs über die Expression von GFP von Thelp unterschieden werden

Um Tregs und Thelp zu unterscheiden gibt es verschiedene Strategien (siehe Einleitung 1.1.3.). Beide Populationen gehören zu den CD4⁺ T Zellen (Abb. 3.1A). In naiven Mäusen können Tregs und Thelp anhand der Expression der Interleukin-2 Rezeptor alpha-Kette, (CD25) unterschieden werden. Naive Tregs exprimieren hohe Mengen CD25 (Cheng *et al.*, 2011), wo hingegen naive Thelp kein CD25 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Abb. 3.1). Unter nicht naiven Bedingungen, wie z.B. während einer Infektion, wird CD25 aber auch auf aktivierten Thelp Zellen hochreguliert und eignet sich deshalb nur bedingt als Marker für Tregs. Ein spezifischerer Marker ist Foxp3. Dieser Transkriptionsfaktor wird konstitutiv von Tregs exprimiert, nicht aber in Thelp (Abb. 3.1). Ein Nachteil der Bestimmung von Foxp3 ist die zur Anfärbung von intrazellulären Proteinen nötige Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Auf diese Weise charakterisierte Zellen lassen sich nicht mehr in Experimenten einsetzen, in denen vitale, funktionelle Tregs benötigt werden.

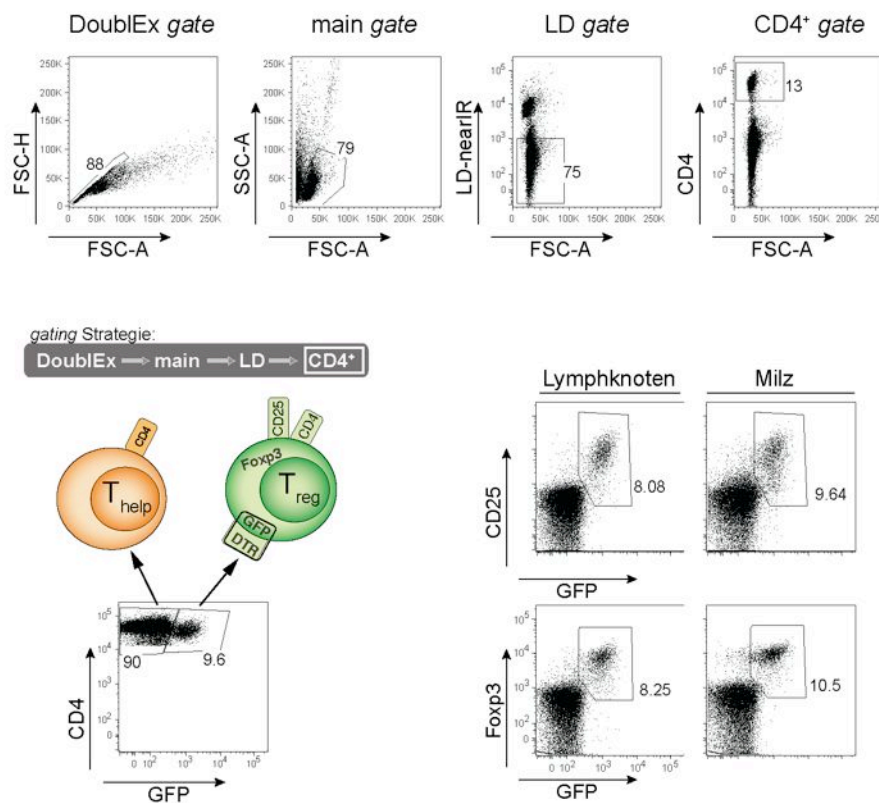


Abb: 3.1 Tregs in DEREГ Mäusen exprimieren CD25, Foxp3 und GFP

Aufgereinigte Splenozyten einer C57BL/6 DEREГ Maus wurde mit anti-CD4, anti-CD25, anti-Foxp3 und LD nearIR angefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Für die Analyse wurden in der gating Strategie nur lebende CD4⁺ Zellen berücksichtigt (LDnearIR negativ). In DEREГ Mäusen erfolgte die Differenzierung von Tregs und Thelp über die Expression von GFP. Zellen, welche GFP exprimieren zeigen eine Koexpression anderer Treg spezifischer Marker wie CD25 oder Foxp3. Die Zahlen geben jeweils den prozentualen Anteil der Zellen im *gate* an, bezogen auf alle dargestellten Zellen. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Ein alternativen Ansatz zur Charakterisierung von Tregs bietet eine transgene Reportermaus: die DEREK Maus (Lahl *et al.*, 2007). Diese Mäuse exprimieren ein GFP-DTR Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3-Genlokus. So können Tregs in vitalem Zustand leicht von Thelp durch die Expression von GFP unterschieden werden. Bei naiven DEREK Mäusen korreliert zudem die Expression von GFP gut mit der von CD25 und Foxp3 (Abb. 3.1). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden DEREK Mäuse in den meisten Experimenten dieser Arbeit eingesetzt.

3.1.2 Tregs exprimieren höhere Level an P2X7, CD38, CD39 als Thelp

Extrazelluläre Nukleotide bilden Liganden und Substrate für eine Reihe von membranständigen Rezeptoren und ecto-Enzymen. Auch CD4⁺ T Zellen sind mit einer Vielzahl dieser Proteine ausgestattet (Salmi and Jalkanen, 2005). So wird extrazelluläres NAD⁺ von der ADP-Ribosyltransferase 2 (ART2) und der NAD-Glykohydrolase CD38 als Substrat verwendet. ART2 katalysiert den kovalenten Transfer der ADP-Ribose (ADPR) Gruppe von NAD⁺ auf Argininreste von Zielproteinen, wo hingegen CD38 die Spaltung von NAD⁺ in ADPR oder zyklische ADP-R (cADPR) katalysiert. Der Ionenkanal P2X7 ist ein Zielprotein von ART2 und kann durch ADP-Ribosylierung aktiviert werden. Zudem kann auch ATP als löslicher Ligand die Aktivierung dieses Kanals auslösen (Haag *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2009). Extrazelluläres ATP wird seinerseits durch die Nukleosid Triphosphat Diphosphohydrolase CD39 zu ADP und AMP degradiert (Deaglio *et al.*, 2007). Die Aktivierung von P2X7 wird somit sowohl durch den CD38 vermittelten Abbau von NAD⁺ als auch den CD39 vermittelten Abbau von ATP limitiert. Um zu untersuchen ob sich Treg und Thelp in der Expression dieser vier Proteine (ART2, P2X7, CD38 und CD39) unterscheiden wurden Milz- und Lymphknotenzellen von C57BL/6 DEREK Mäusen durchflusszytometrisch untersucht.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse der CD4⁺ T Zellen zeigen, dass GFP⁺ Tregs und GFP⁻ Thelp aus den Lymphknoten und der Milz von C57BL/6 DEREK Mäusen eine vergleichbar starke Expression von ART2 aufweisen (Abb. 3.2A). Ferner ist zu sehen, dass sich die GFP⁻ Thelp aus den Lymphknoten von denen aus der Milz in einer Subpopulation unterscheiden. In der Milz ist eine kleine Subpopulation an CD4⁺ GFP⁻ Zellen sichtbar, welche am höchsten ART2 exprimieren. Diese Subpopulation ist nicht im Lymphknoten nachweisbar. Vermutlich handelt es sich dabei um CD4⁺ natürliche Killer T Zellen (NKT Zellen), welche für ihre starke ART2 Expression bekannt sind (Kawamura *et al.*, 2006).

Die P2X7 Expressionsanalyse zeigt dass GFP⁺ Tregs eine höhere P2X7 Expression als die Mehrzahl konventioneller GFP⁻ Thelp. In der Milz findet sich eine Subpopulation an CD4⁺ GFP⁻ Zellen, welche P2X7 vergleichbar stark wie die GFP⁺ Tregs exprimieren (Abb.3.2B).

Die Ergebnisse zeigen ferner, dass CD38 nur von einem geringen Teil der konventionellen GFP⁻ Thelp exprimiert wird. Im Kontrast dazu exprimieren rund 50% aller GFP⁺ Tregs im Lymphknoten und 75% aller GFP⁺ Tregs aus der Milz CD38 (Abb. 3.2C). Noch deutlicher unterscheiden sich GFP⁺ Tregs und GFP⁻ Thelp in der Expression von CD39: sowohl im

Lymphknoten als auch in der Milz exprimieren mehr als 80% der GFP⁺ Tregs jedoch weniger als 15% der Thelp CD39 (Abb. 3.2D). Die im Rahmen der Expressionsanalyse beobachtete höhere Expression von P2X7, CD38 und CD39 sowie die im allgemeinen hohe ART2 Expression aller CD4⁺ T Zellen deuten darauf hin, dass extrazellulärer Nukleotide wie NAD⁺ und ATP möglicherweise einen größeren Einfluss auf Tregs als auf Thelp ausüben.

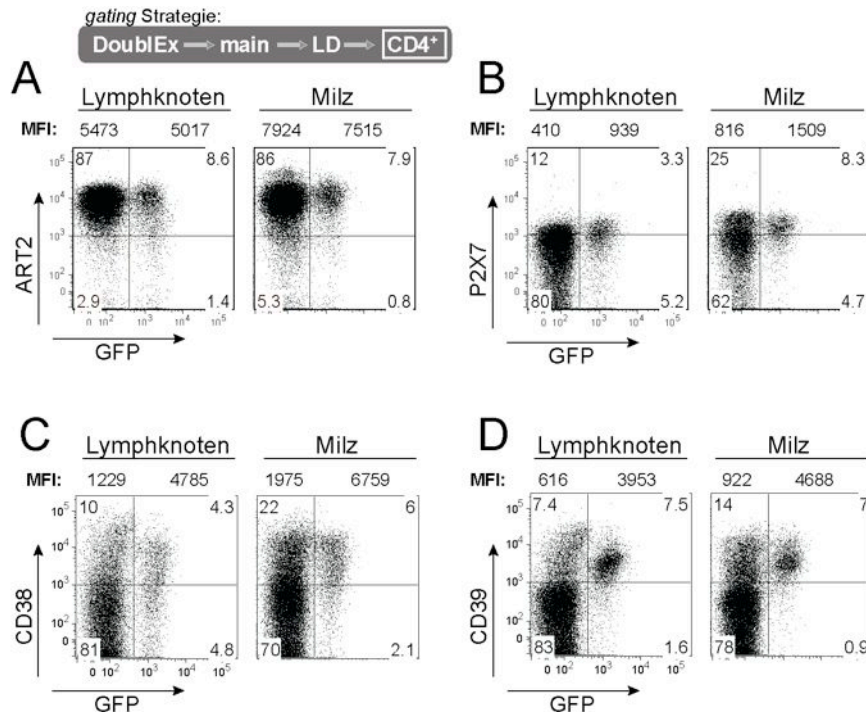


Abb: 3.2 Tregs zeigen eine höhere Expression von P2X7, CD38 und CD39 als Thelp.

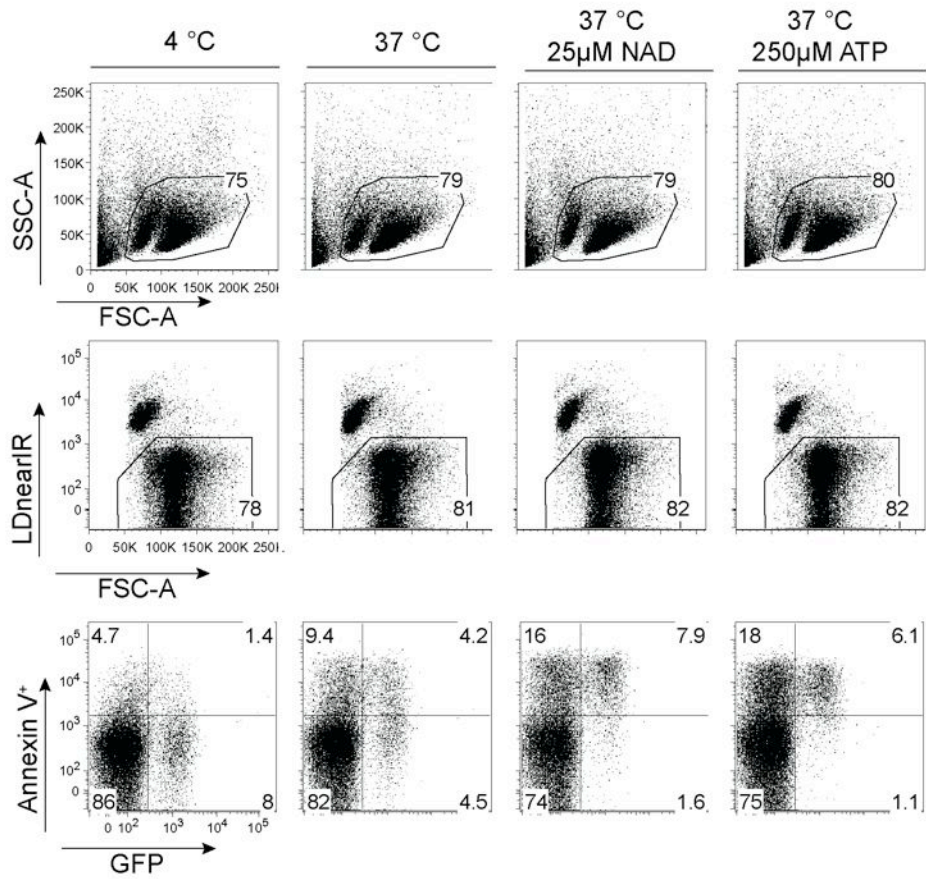
Aufgereinigte Splenozyten und Lymphknoten Zellen einer C57BL/6 DEREK Maus wurden mit Antikörpern gegen CD4 und (A) ART2.2, (B) P2X7, (C) CD38 oder (D) CD39 angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Zahlen innerhalb der FACS Diagramme geben jeweils den prozentualen Anteil der Zellen in dem Quadranten an, bezogen auf alle dargestellten Zellen. Die Zahlen oberhalb der Diagramme zeigen jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Zelloberflächenproteins auf GFP⁻ (Thelp) und GFP⁺ (Tregs) Zellen. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

3.1.3 Tregs reagieren schon auf geringe Mengen NAD⁺ mit Externalisation von PS und Abspaltung von CD27

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass CD4⁺ T Zellen auf NAD⁺ und ATP reagieren, wenn sie in Gegenwart dieser Nukleotide bei 37 °C inkubiert werden (Scheuplein *et al.*, 2009). Als Reaktion auf die Inkubation erscheint Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche, ein Prozess der als PS *flashing* bezeichnet wird. Ebenso reagieren die Zellen mit der Abspaltung von Zelloberflächenmolekülen wie CD27 und CD62L. Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass extrazelluläre Nukleotide einen stärkeren Einfluss auf Tregs als auf Thelp haben könnten.

Um den Einfluss von extrazellulärem NAD⁺ und ATP auf Tregs und Thelp zu vergleichen, wurden die Externalisation von PS und die Abspaltung von CD27 als Indikatoren für die NAD und ATP vermittelte Aktivierung von P2X7 verwendet (Abb. 3.3). Hierfür wurden Milzzellen von C57BL/6 DEREK Mäusen präpariert und in Gegenwart von steigenden

A



B

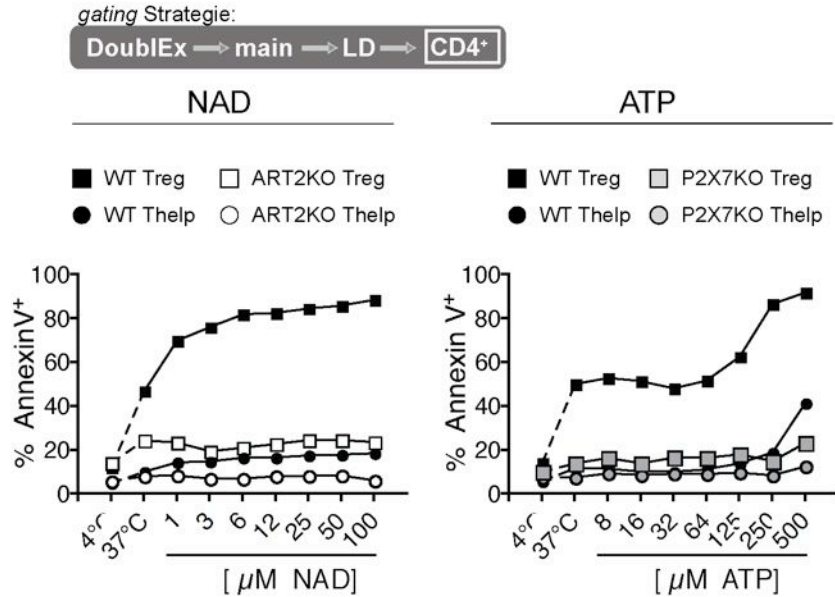


Abb. 3.3: Tregs reagieren auf geringe Mengen NAD mit der Externalisation von Phosphatidylserin.

(A) Splenozyten einer C57BL/6 WT DEREK Maus wurden für 15 min in Abwesenheit und Gegenwart von 25 μM NAD⁺ oder 250 μM ATP bei 37 °C inkubiert oder bei 4 °C gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit dem lebend/tot Farbstoff LDnearIR sowie anti-CD4 und AnnexinV gefärbt und im FACS analysiert. (B) Splenozyten von C57BL/6 DEREK WT, C57BL/6 DEREK ART2KO und C57BL/6 DEREK P2X7KO Mäusen wurden mit 1 - 100 μM NAD⁺ oder 8 - 500 μM ATP für 15 min bei 37 °C inkubiert. Kontrollzellen wurden ohne NAD/ATP bei 4 °C und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4 und AnnexinV gefärbt und im FACS analysiert. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

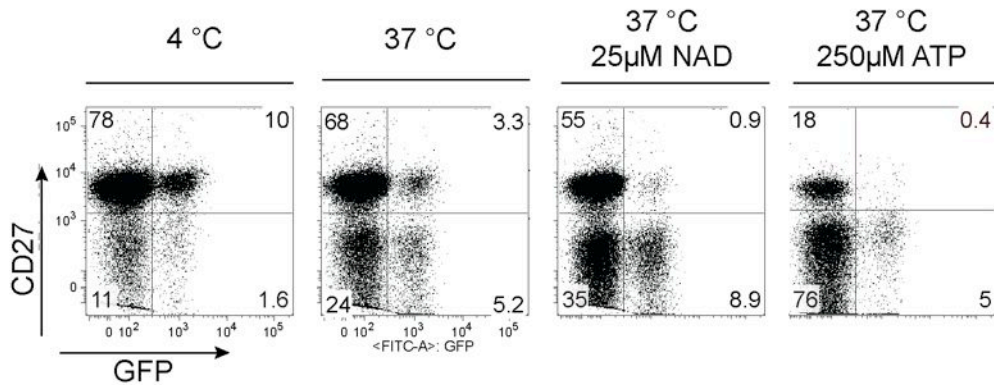
Konzentrationen von NAD⁺ oder ATP bei 37 °C inkubiert. Kontrollzellen wurden ohne NAD/ATP bei 4 °C und 37 °C inkubiert. Parallel wurden Zellen aus ART2ko DEREK und P2X7ko DEREK Mäusen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass CD4⁺ T Zellen unter 4 °C Bedingungen kaum PS externalisieren (Abb. 3.3.A, Panel 1). Wurden die Zellen auf 37 °C in Abwesenheit von exogenem NAD⁺ oder ATP erwärmt, so reagierten weniger als 10% der konventionellen Thelp mit PS *flashing*. Im Kontrast dazu zeigen ca. 45% der Tregs PS auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 3.3.A). Inkubationen bei 37 °C in Gegenwart von exogenem NAD⁺ führten dosisabhängig zu einer verstärkten Externalisation von PS bei Tregs und Thelp (Abb. 3.3.B, Panel 1). Dabei reagierten die Tregs stärker als die Thelp. Eine exogene NAD⁺ Konzentration von 1 µM reichte bereits aus, um PS *flashing* bei ca. 70% der Tregs auszulösen. Selbst durch die Inkubation mit 100 µM NAD⁺ konnte nur bei ca. 20% der Thelp PS *flashing* ausgelöst werden (Abb. 3.3.B). Inkubationen in Gegenwart von exogenem ATP führten erst bei Konzentrationen von 125 µM bei Tregs und bei 250 µM bei Thelp zu einer stärkeren Reaktion als bei Inkubationen ohne exogenem NAD⁺ oder ATP.

Die Externalisation von PS durch ca. 40% der Tregs bei 37 °C Inkubation ohne exogenem NAD⁺ oder ATP erklärt sich am ehesten dadurch, dass schon während der Zellpräparation NAD⁺, aber nicht ATP, in ausreichenden Mengen von Zellen freigesetzt wird (Scheuplein *et al.*, 2009). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass ART2ko Tregs weder auf exogenem NAD⁺ noch auf die 37 °C Inkubation ohne exogenem NAD⁺ reagieren. Zudem reagieren Tregs mit verstärkter Externalisation von PS auf exogenem NAD⁺ bereits bei Konzentrationen im einstelligen µM Bereich, auf exogenem ATP jedoch erst bei Konzentrationen im dreistelligen µM Bereich (Abb. 3.3.B).

Neben der Externalisation von PS wurde auch der Verlust von CD27 von der Zelloberfläche im selben Experiment untersucht. Dabei erwiesen sich die Ergebnisse kongruent mit denen des PS *flashing*: unter 4 °C Bedingungen ist CD27 bei einem Großteil aller CD4⁺ T Zellen auf der Zelloberfläche detektierbar. Werden die Zellen ohne Zugabe von exogenem NAD⁺ oder ATP bei 37 °C stimuliert, so zeigen bereits die Mehrzahl von Tregs sowie ein kleiner Anteil der Thelp einen Verlust von CD27 (Abb. 3.3.A). Auch der Kurvenverlauf des Dosis-Wirkungsexperiments ist ähnlich dem der PS *flashing* Analyse: Tregs und Thelp reagieren dosisabhängig, bereits bei niedrigen Konzentrationen exogenem NAD⁺ mit einem verstärkten Verlust von CD27. Während schon 60% der Tregs auf geringe, bei der Präparation freigesetzte, Mengen NAD⁺ CD27 abstoßen, reagierten nur 40% der Thelp auf die maximale Konzentration von 100 µM NAD. Eine erkennbare Reaktion auf exogenem ATP erfolgte - wie bei der Externalisation von PS - im Fall der CD27 Abspaltung ebenfalls erst bei ATP Konzentrationen über 125 µM bei Tregs und bei einer ATP

A

gating Strategie:



B

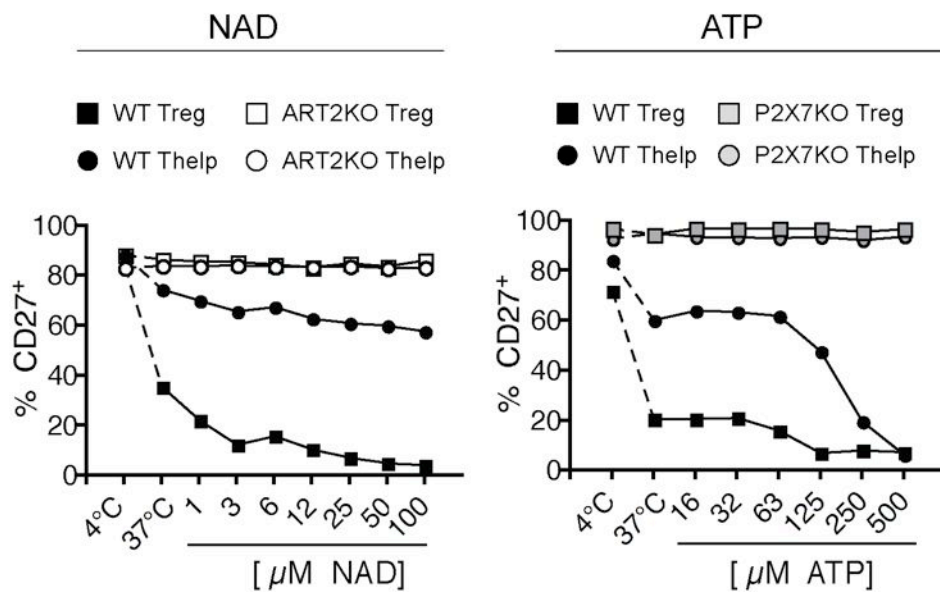


Abb. 3.4: Tregs reagieren auf geringe Mengen NAD mit der Abspaltung von CD27.

(A) Splenozyten einer C57BL/6 DEREK WT Maus wurden für 15 min in Abwesenheit oder Gegenwart von 25 μM NAD⁺ oder 250 μM ATP bei 37 °C inkubiert oder bei 4 °C gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4 und anti-CD27 gefärbt und im FACS analysiert. (B) Splenozyten von C57BL/6 DEREK WT, C57BL/6 DEREK ART2ko und C57BL/6 DEREK P2X7ko Mäuse wurden mit 1-100 μM NAD⁺ oder 8-500 μM ATP für 15 min bei 37 °C inkubiert. Kontrollzellen wurden ohne NAD/ATP bei 4 °C und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4 und anti-CD27 gefärbt und im FACS analysiert. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Konzentration von über 250 μM bei Thelp. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass Tregs sensitiv auf extrazelluläres NAD⁺ schon in einem Konzentrationsbereich von unter 1 μM NAD⁺ reagieren. Thelp hingegen reagieren nur schwach selbst auf 100-fach höhere NAD⁺ Konzentrationen. Auch auf extrazelluläres ATP reagierten Tregs etwas sensitiver als Thelp.

3.1.4 Tregs reagieren schnell auf NAD⁺ und ATP mit PS *flashing* und

CD27 Abspaltung

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Tregs aus C57BL/6 WT-Mäusen wesentlich empfindlicher auf eine 15 minütige Inkubation mit den extrazellulären Nukleotiden NAD und ATP reagieren als Thelp. Um zu überprüfen, ob die Inkubationsdauer Einfluss auf die Sensitivität von Tregs und Thelp auf extrazelluläres NAD⁺ und ATP hat, wurden Kinetik Experimente durchgeführt. Hierfür wurden C57BL/6 WT DEREK Milzzellen für 0 - 30 min mit 30 μ M NAD⁺ oder 300 μ M ATP bei 37 °C inkubiert. Parallel wurden Milzzellen von CD57BL/6 ART2ko DEREK und von C57BL/6 P2X7ko DEREK Mäusen untersucht. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie zuvor im Durchflusszytometer auf Externalisation von PS und auf Verlust von CD27 untersucht.

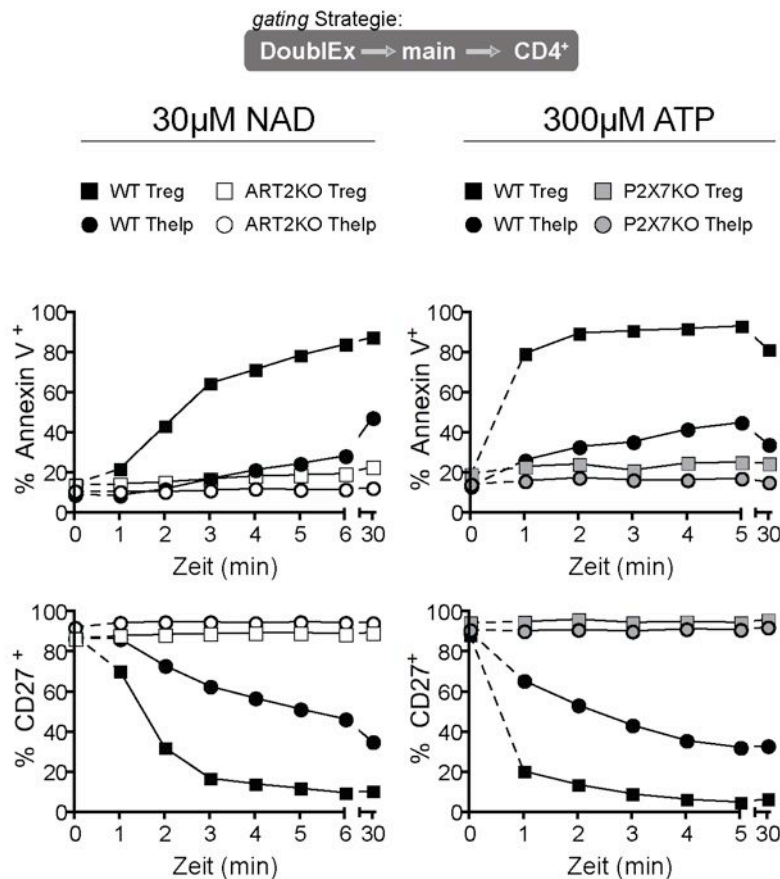


Abb 3.5: Tregs reagieren schon nach wenigen Minuten auf NAD⁺ und ATP

Splenozyten von C57BL/6 DEREK (WT, ART2ko, P2X7ko) Mäusen wurden für 1 - 30 min in Gegenwart von 30 μ M NAD⁺ oder 300 μ M ATP inkubiert oder bei 4 °C (0 min) belassen. Anschließend wurden die Zellen mit mit AnnexinV und anti-CD27 angefärbt und abschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Tregs als auch Thelp binnen weniger Minuten auf NAD⁺ und ATP Stimuli reagieren (Abb. 3.5), wobei Tregs wesentlich schneller als Thelp halbmaximale Reaktionswerte erreichten. Wie zuvor reagierte bei allen Versuchsansätzen ein deutlich höherer Anteil an Tregs als an Thelp mit PS-Externalisation und Verlust von CD27. So löste die Inkubation mit 30 µM NAD⁺ innerhalb von 2 - 3 Minuten PS flashing bei 60% der Tregs aus. Nach 30 min waren ca. 80% der Tregs AnnexinV⁺ (Abb. 3.5). Die NAD⁺ induzierte Abspaltung von CD27 erfolgte ebenfalls binnen 2 - 3 Minuten bei > 85% der Tregs. Konventionelle Thelp reagierten hingegen wesentlich langsamer auf NAD⁺. In den ersten sechs Minuten nach Beginn der NAD⁺ Inkubation waren bei diesen Zellen noch keine halbmaximalen Werte des PS flashing erreicht. Die Abspaltung von CD27 verlief ebenfalls langsamer als bei den Tregs. Die Reaktion auf 300 µM ATP erfolgte sowohl bei Tregs als auch bei Thelp schneller als die Reaktion auf 30 µM NAD⁺. Bereits nach einer Minute bei 37 °C zeigten Tregs mehr als halbmaximale Reaktionen, sowohl in Bezug auf PS flashing als auch Verlust von CD27 (Abb. 3.5). Im weiteren Zeitverlauf war kaum eine weitere Steigerung sichtbar. Thelp reagierten auch auf ATP langsamer und erreichten erst nach 2 - 3 min halbmaximale Werte für PS Exposition und Abspaltung von CD27 .

3.1.5 Tregs zeigen als Reaktion auf NAD⁺ und ATP einen starken Calcium-Einstrom, welcher zeitlich mit der Abspaltung von CD62L korreliert

Die sensitive Reaktion von C57BL/6 WT Tregs auf NAD⁺ und ATP (Abb. 3.3-3.5) könnte auf die hohe Expression von P2X7 auf diesen Zellen (Abb. 3.2) zurückzuführen sein. Die Ligandenbindung an P2X7 induziert die Öffnung des Ionenkanals und den Einstrom von Calcium Ionen. Dieses kann über Calcium-sensitive Farbstoffe wie Fluo4-AM sichtbar gemacht werden. Um zu untersuchen, in wie fern die Kinetik des durch die Aktivierung von P2X7 bedingten Calcium Einstroms mit der Abspaltung des Zelloberflächenproteins CD62L auf Tregs und Thelp korreliert, wurden Milzzellen von C57BL/6 WT Mäusen isoliert und mit Fluo4-AM beladen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS, 30 µM NAD⁺ oder 300 µM ATP bei 4 °C inkubiert. Während die Proben im Durchflusszytometer gemessen wurden, wurde die Temperatur mittels einer Infrarot-Lampe kontinuierlich auf 37 °C erhöht und der Temperaturanstieg, der Einstrom von Ca²⁺ sowie die Abspaltung von CD62L über einen Zeitraum von 20 min gemessen (Abb. 3.6).

Die Ergebnisse zeigen einen Zeit- und Temperatur-abhängigen Anstieg der Fluo4-AM Fluoreszenz, selbst in Abwesenheit von exogen zugefügtem NAD⁺ und ATP. Dieser Anstieg erreichte bei Tregs deutlich höhere Werte als bei Thelp. Möglicherweise reagieren Tregs bereits auf das bei der Präparation freigesetzte NAD⁺ (Abb. 3.6A). Wurden die Zellen mit 30 µM exogenem NAD⁺ inkubiert, so war ein stärkerer Ca²⁺ Einstrom zu beobachten. Ein noch stärkeres Ca²⁺ Signal war bei der Inkubation mit 300 µM ATP zu sehen. Der Verlust von CD62L erfolgte bei Tregs bei allen drei Inkubationen nahezu zeitgleich mit dem Einstrom von Ca²⁺ Ionen (Abb. 3.6B). Konventionelle Thelp zeigten während der 37 °C Inkubation ohne exogen zugesetzte Nukleotide nur einen schwachen Anstieg der Fluor4-AM

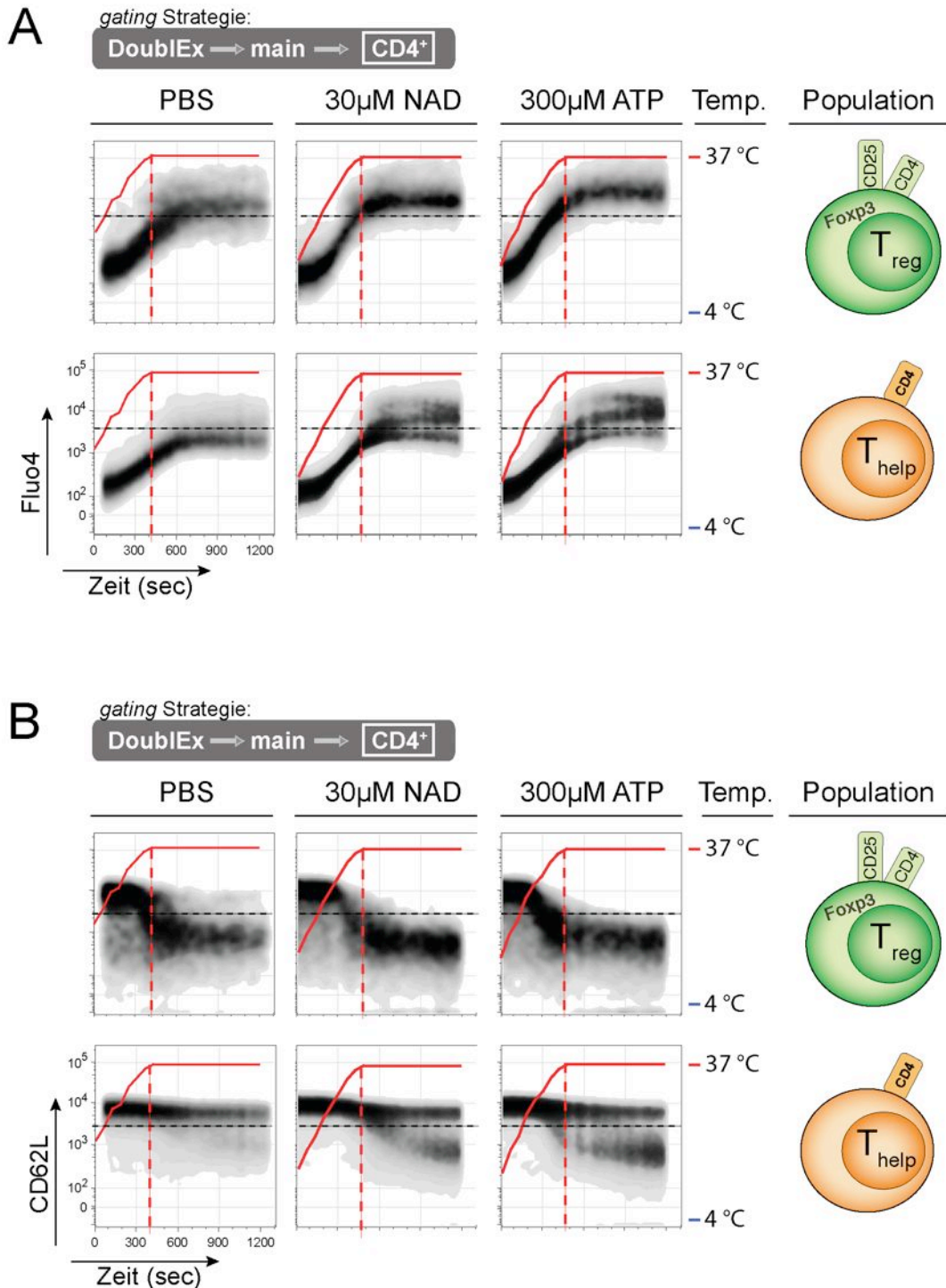


Abb 3.6: Tregs reagieren temperaturabhängig mit einem Ca²⁺ Influx und dem Verlust von CD62L auf extrazelluläres NAD⁺ und ATP

Milzzellen einer C57BL/6 WT Maus wurden mit anti-CD62L, anti-CD4, anti-CD25 und dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fluo4-AM gefärbt und anschließend bei 4 °C mit PBS, 30 μ M NAD⁺ oder 300 μ M ATP inkubiert. Die Proben wurden direkt im FACS analysiert während die Temperatur kontinuierlich erhöht und jede Minute gemessen wurde (rote durchgehende Linie). Die rote gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt, zu dem eine Temperatur von 37 °C im Reaktionsansatz erreicht wurde. Dargestellt sind (A) der Einstrom von Ca²⁺ und (B) die Abspaltung von CD62L, analysiert auf Tregs (CD4⁺CD25⁺) und Thelp (CD4⁺CD25⁻) über einen Zeitraum von 20 min. Die schwarze gestrichelte Linie dient als Orientierungshilfe zur leichteren vergleichenden Beurteilung des Reaktionsverlaufs.

Fluoreszenz und keinen erkennbaren Verlust von CD62L. Erst bei Inkubation mit 30 μM NAD^+ oder 300 μM ATP konnte bei einer diskreten Subpopulation von Thelp Ca^{2+} Influx und Verlust von CD62L ausgelöst werden. Dabei erfolgten die Reaktionen auf ATP etwas schneller als die auf NAD^+ .

Die Ergebnisse zeigen, dass Tregs mit einem stärkeren Influx von Ca^{2+} Ionen auf NAD^+ und ATP reagieren als Thelp. Damit stützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass die hohe P2X7 Expression auf den Tregs mit der hohen Sensitivität gegenüber NAD^+ und ATP in Zusammenhang steht.

3.1.6 Tregs aus C57BL/6 Mäusen sind empfindlicher gegenüber NAD^+ als Tregs aus Balb/c und DBA/1 Mäusen

Der Inzuchtmausstamm C57BL/6 ist der am meisten genutzte Mausstamm sowohl bei immunologischen als auch nicht-immunologischen Fragestellungen (www.jax.com). Neben C57BL/6 gibt es aber noch weitere Mausstämmen, die für die immunologische Forschung von Bedeutung sind. So können einige Krankheitsmodelle besser in bestimmten Mausstämmen ausgelöst und untersucht werden. DBA/1 Mäuse werden beispielsweise bevorzugt für das Modell der Kollagen-induzierte Arthritis genutzt (Germann *et al.*, 1995). Die Rolle des genetischen Hintergrunds wird deutlich in einem auf Ovalbumin (OVA) basierenden Asthmamodell (Säfholm *et al.*, 2011). Hier reagieren C57BL/6 auf Applikationen von OVA mit einer TH1 ähnlichen Immunreaktion, Balb/c hingegen reagieren mit einer TH2 ähnlichen Immunreaktion und zeigen einen heftigeren Krankheitsverlauf (Säfholm *et al.*, 2011; Srikiatkhachorn *et al.*, 1999). Auch im Bereich der purinergen Signaltransduktion wurden genetische Unterschiede bei verschiedenen Mausstämmen entdeckt. So kommt die Punktmutation P451L des P2X7 Rezeptors in C57BL/6 und DBA/1 Mäusen vor und beeinträchtigt die Funktion des Rezeptors, Balb/c Mäuse hingegen tragen die WT Variante des Rezeptors (Adriouch *et al.*, 2002). Die eng benachbarten ART2 Gene zeigen in den genannten Mausstämmen ebenfalls allele Unterschiede (Hollmann *et al.*, 1996). In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Tregs aus C57BL/6 Mäusen besonders empfindlich gegenüber extrazellulärem NAD sind und schon auf geringste Mengen NAD^+ mit einem schnellen Influx von Calcium, der Externalisation von PS und dem Verlust von CD27 und CD62L reagieren.

Um zu ermitteln, ob eine erhöhte Sensitivität von Tregs gegenüber Thelp auch in anderen Mausstämmen vorkommt, wurden die für C57BL/6 durchgeführten Expressionsanalysen und Dosis-Wirkungsexperimente vergleichend auch mit Zellen aus Balb/c und DBA/1 Mäuse durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Thelp als auch Tregs aus Balb/c und DBA/1 Mäuse weniger ART2 exprimieren als CD4^+ T Zellen aus C57BL/6 Mäusen. Die Expression von P2X7 war hingegen vergleichbar mit der von Zellen aus C57BL/6 Mäusen (Abb. 3.7A). Die Ergebnisse der NAD^+ Dosis-Wirkungsanalysen zeigen, dass Tregs aus Balb/c und DBA/1 Mäusen schwächer auf NAD^+ reagieren als Tregs aus C57BL/6 Mäusen (Abb. 3.7C), Balb/c Thelp hingegen etwas empfindlicher reagierten als C57BL/6 Thelp. Bei

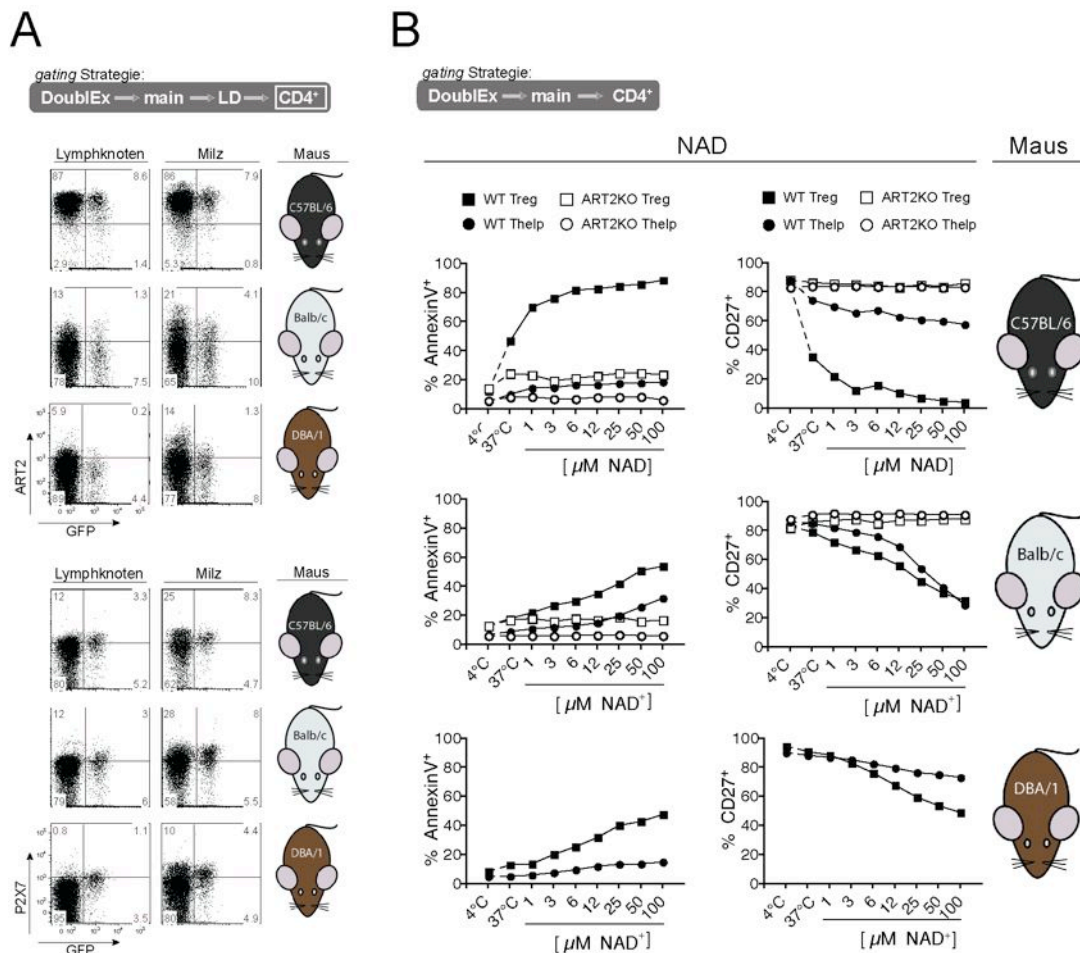


Abb. 3.7 Balb/c und DBA/1 Mäuse exprimieren weniger ART2 und reagieren schwächer auf NAD⁺ als C57BL/6 Mäuse.

(A) Die Expression von ART2 und P2X7 wurde bei C57BL/6, Balb/c und DBA/1 Mäusen verglichen. (B) In Dosis-Wirkungsexperimenten wurde die NAD⁺ Sensitivität der CD4⁺ T Zellen der drei Mausstämmen im Bereich von 1 - 100 μM NAD⁺ untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C inkubiert. Als Parameter für die Reaktion auf NAD⁺ wurde das PS flashing und die CD27 Abspaltung analysiert. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

allen drei Mausstämmen reagierte ein höherer Anteil von Tregs auf NAD⁺ als von Thelp, wobei dieser Unterschied in der Sensitivität von Tregs vs. Thelp gegenüber extrazellulärem NAD⁺ bei C57BL/6 Mäusen am stärksten ausgeprägt ist. Die Ergebnisse führen zur Vermutung, dass neben einer hohen P2X7 Expression auch eine hohe ART2 Expression für eine hohe Sensitivität gegenüber NAD⁺ notwendig ist, so wie dies bei C57BL/6 Tregs zu finden ist.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass Tregs sensitiver auf extrazelluläres NAD⁺ und ATP reagieren als Thelp aus den selben Mäusen. Besonders auffällig war die hohe Empfindlichkeit gegenüber extrazellulärem NAD⁺ bei Tregs aus C57BL/6 Mäusen, die zu einem Großteil schon bei NAD⁺ Konzentrationen von 1 μM mit PS flashing, Calcium-Einstrom, sowie der Abspaltung von CD27 und CD62L reagierten, wohingegen selbst bei einer 100fach höheren NAD⁺ Konzentration nur ein geringer Anteil von Thelp entsprechend

reagierte. Die Ergebnisse von Kinetik Experimente zeigen, dass die halbmaximale Reaktion der Tregs auf NAD bereits in 2 - 3 min, bei Thelp hingegen erst nach 6 min erreicht wird. Die hohe NAD⁺ und ATP Empfindlichkeit könnte auf die hohe P2X7 Expression der Tregs zurückzuführen sein. Vergleichende Versuche mit verschiedene Mausstämmen zeigten, dass der Unterschied in der NAD Sensitivität von Tregs vs. Thelp bei C57BL/6 am stärksten ausgeprägt ist. Die schwächere Reaktion von Treg aus Balb/c und DBA/1 Mäusen auf NAD⁺ könnte auf eine schwächere ART2 Expression zurückzuführen sein.

3.2 Untersuchung des Einflusses des bei der Zellpräparation freigesetzten NADs auf die Funktion der Tregs sowie des Einflusses ART2-inhibierender Nanobodies

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts haben gezeigt, dass Tregs empfindlich auf NAD⁺ reagieren, selbst auf das bei der Zell-Präparation freigesetzte NAD⁺. Es stellt sich die Frage, ob die dadurch ausgelöste Aktivierung von P2X7 bei 37 °C einen Einfluss auf die Funktion von Tregs in nachfolgenden Untersuchungen hat. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die chronische Aktivierung von P2X7 bei verschiedenen Zellen einen apoptotisch-nekrotischen Zelltod induziert (Seman *et al.*, 2003; Adinolfi *et al.*, 2005; Kawamura *et al.*, 2005). Im folgenden wird zunächst untersucht, ob und inwiefern das bei der Zellpräparation freigesetzte NAD⁺ bei Tregs den Zelltod auslöst. Zudem wird ein möglicher Einfluss von NAD⁺ auf die Suppressor Funktion der Tregs in einem Standard *in vitro* T Zell Suppressionsversuch ermittelt.

Als experimentelle Hilfsmittel werden bei diesen Versuchen CD38ko Mäuse sowie ART2-inhibierende Nanobodies eingesetzt. CD38 ist eine NAD-Glycohydrolase, die NAD zu ADP-Ribose (ADPR) und zyklischer-ADP-Ribose (cADPR) hydrolysiert. In der Abwesenheit von CD38 wird weniger extrazelluläres NAD⁺ abgebaut, so dass mehr NAD⁺ für die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 zur Verfügung steht (Krebs *et al.*, 2005) und NAD-vermittelte Effekte dadurch verstärkt werden. s+16a ist eine ART2-spezifischer Nanobody, der die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 und anderen Membranproteinen blockiert (Koch-Nolte *et al.*, 2007).

3.2.1 Bei der Präparation freigesetztes NAD⁺ induziert die ART2-abhängige

Apoptose von Tregs

Im Rahmen der NAD⁺ Dosis-Wirkungsanalysen wurde beobachtet, dass Tregs auch ohne NAD⁺ Zugabe PS auf ihrer Zelloberfläche zeigen, wenn sie bei 37 °C inkubiert werden (Abb 3.3). Die Tatsache, dass Tregs aus ART2ko und P2X7ko unter diesen Umständen kein PS externalisieren, deutete an, dass dieses Phänomen auf eine Freisetzung von NAD⁺ während der Zellpräparation zurückzuführen ist (Abb. 3.3).

Um einen möglichen Effekt von freigesetztem NAD⁺ besser sichtbar zu machen, wurden zusätzlich CD38ko Mäuse untersucht, bei denen NAD-induzierte Effekte aufgrund der fehlenden NAD-Hydrolase Aktivität verstärkt sein sollten. Hierzu wurden Milzzellen von verschiedenen C57BL/6 DEREK Mausstämmen (WT, CD38ko, ART2ko und P2X7ko) isoliert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass ca. 50% der WT Tregs nach der 37 °C Inkubation PS auf ihrer Zelloberfläche exponieren (Abb. 3.8). Während ART2ko und P2X7ko - wie schon bei den Dosis-Wirkungsanalysen (Abb 3.3) - keine über den Hintergrund hinausgehende Reaktion zeigten, reagierten > 80% der Tregs aus CD38ko Mäusen mit einer Externalisation von PS. Auch bei Thelp ist ein mit der Zellpräparation

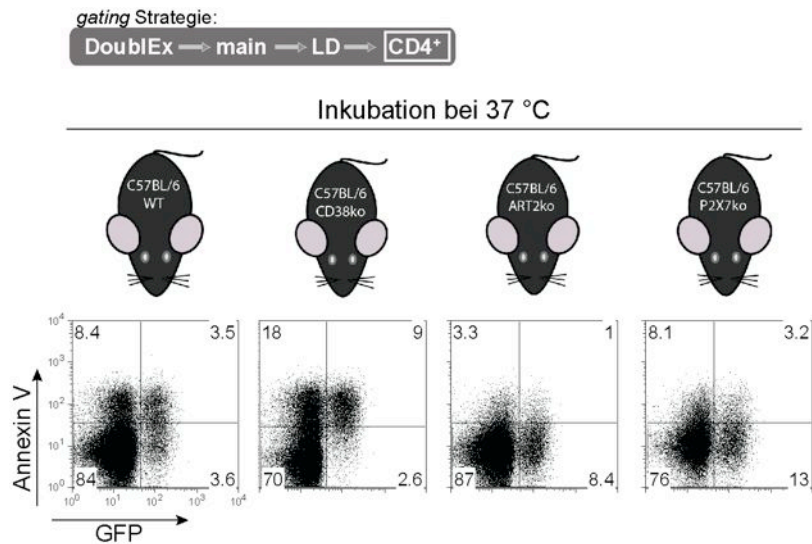


Abb 3.8: CD38ko Tregs reagieren verstärkt mit PS flashing auf bei der Zellpräparation freigesetztes NAD⁺ Milzzellen von C57BL/6 DEREK (WT, CD38ko, ART2ko, P2X7ko) Mäusen wurden bei 37 °C für 15 min inkubiert, mit anti-CD4 und AnnexinV gefärbt und im FACS analysiert. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

assoziierter Effekt zu beobachten, wenn auch wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Tregs. Auch hier reagierte ein deutlich größerer Anteil von Thelp aus CD38ko Tieren (> 20 %) als aus WT Tieren (<10%).

Mit diesem Experiment konnte zum einen bestätigt werden, dass bei der Zellpräparation freigesetztes NAD⁺ ausreicht um - ART2- und P2X7-vermittelt - PS Externalisation bei mehr als der Hälfte aller Tregs und einem geringen Anteil der Thelp auszulösen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass CD38ko Mäuse ein geeignetes Modell sind, diesen NAD-bedingten Effekt besser sichtbar zu machen. Deshalb werden CD38ko Mäuse auch in den folgenden Untersuchungen zum Einfluss von ART2-inhibierenden Nanobodies, und zum Einfluss des bei der Zellpräparation freigesetzten NADs auf die Suppressorfunktion von Tregs eingesetzt.

3.2.2 ART2-blockierende Nanobodies schützen Tregs vor der NAD-induzierten

Apoptose

Um die ART2-abhängige ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Zell-Präparation zu verhindern stand uns der ART2-spezifische Nanobody s+16a zur Verfügung, der die enzymatische Aktivität von ART2 blockiert (Koch-Nolte *et al.*, 2009). Zur Untersuchung der Blockadeigenschaften von s+16a wurden C57BL/6 WT DEREK und CD38ko DEREK Mäuse mit je 100µg s+16a i.v. behandelt. Kontrolltieren wurden 200µl PBS i.v. verabreicht. Die Mäuse wurden 15min nach der Injektion getötet und die Milzzellen wurden präpariert. Um die Externalisation von PS zu untersuchen, wurden die Zellen anschließend für 15 min bei 37 °C inkubiert oder bei 4 °C gelassen. Die Ergebnisse der mit PBS behandelten WT Kontrolltiere zeigen, wie schon zuvor beobachtet (Abb. 3.3), nach einer Inkubation bei 4 °C kaum PS auf der Zelloberfläche von Tregs und Thelp. Wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert,

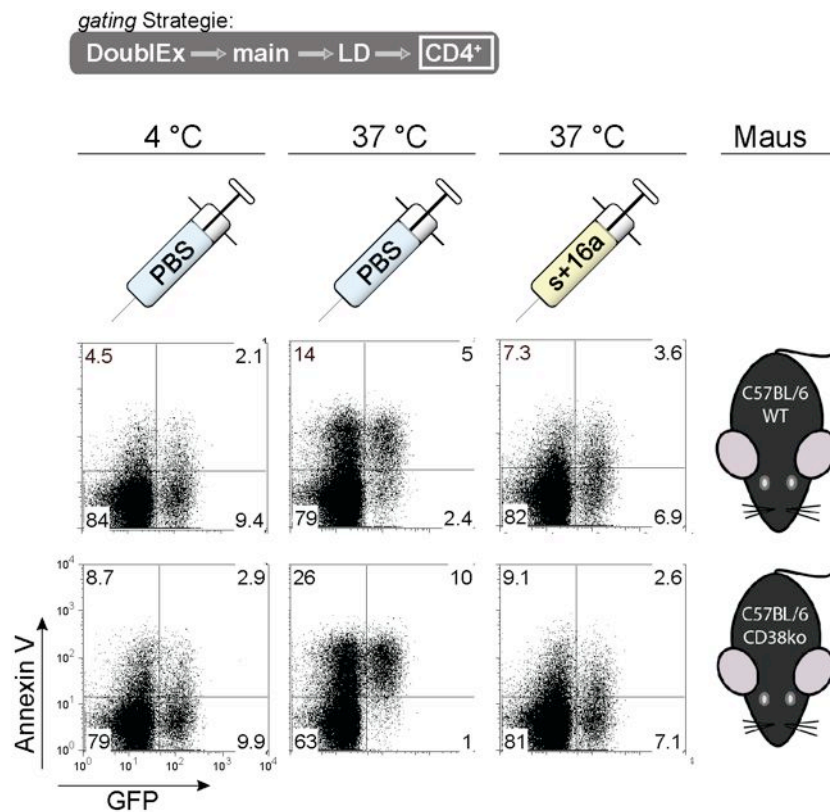


Abb 3.9: Die Injektion des ART2-blockierenden S+16a Nanobodies verhindert die Externalisation von PS, die durch das während der Zellpräparation freigesetzte NAD⁺ induziert wird.

Je einer C57BL/6 DEREK WT und CD38ko Maus wurden 100 µg s+16a i.v. in 200 µl PBS gespritzt, zwei weiteren C57BL/6 DEREK WT und CD38ko Mäusen wurden zur Kontrolle 200 µl PBS i.v. appliziert. Alle Mäuse wurden 30 min post Injektion getötet, die Milzen wurden entnommen und Splenozyten wurden präpariert. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert oder bei 4 °C gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4 und AnnexinV angefärbt und abschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

so externalisierte die Mehrzahl der WT Tregs (70%) und ein geringer Anteil an WT Thelp (15%) PS. Durch die Injektion von s+16a und der damit verbundenen Blockade von ART2 während der Zellpräparation wurde das PS *flashing* während der 37 °C Inkubation deutlich verringert, sowohl bei Tregs als auch bei Thelp (Abb. 3.9). Die ART2 Blockade durch s+16a Injektion zeigte sich auch bei den empfindlicheren CD38ko Mäusen als sehr effektiv. So war zu beobachten, dass 90% der CD38ko Tregs und 30% der CD38ko Thelp von PBS gespritzten Kontrolltieren PS während der 37 °C Inkubation externalisieren. Wurden die Mäuse jedoch mit s+16a vorbehandelt, so wurde das Ausmaß der PS Externalisation bei CD38ko Tregs und Thelp auf den Hintergrund reduziert (Abb. 3.9).

Da die Externalisation von PS eines der ersten Anzeichen für einen Eintritt der Zelle in die Apoptose ist, stellte sich die Frage, wie sich die präparationsbedingte ADP-Ribosylierung langfristig auf die Vitalität der Tregs auswirkt, wenn diese *in vitro* über einen längeren Zeitraum bei 37 °C kultiviert werden. Um die Vitalität der Tregs *in vitro* zu untersuchen, wurden C57BL/6 DEREK WT Mäuse mit PBS oder 100µg s+16a i.v. vorbehandelt. und die präparierten Milzzellen dann für einen Zeitraum von 1 h und 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert oder bei 4 °C gelassen. Die Vitalität der Zellen wurde nach der Inkubation durch

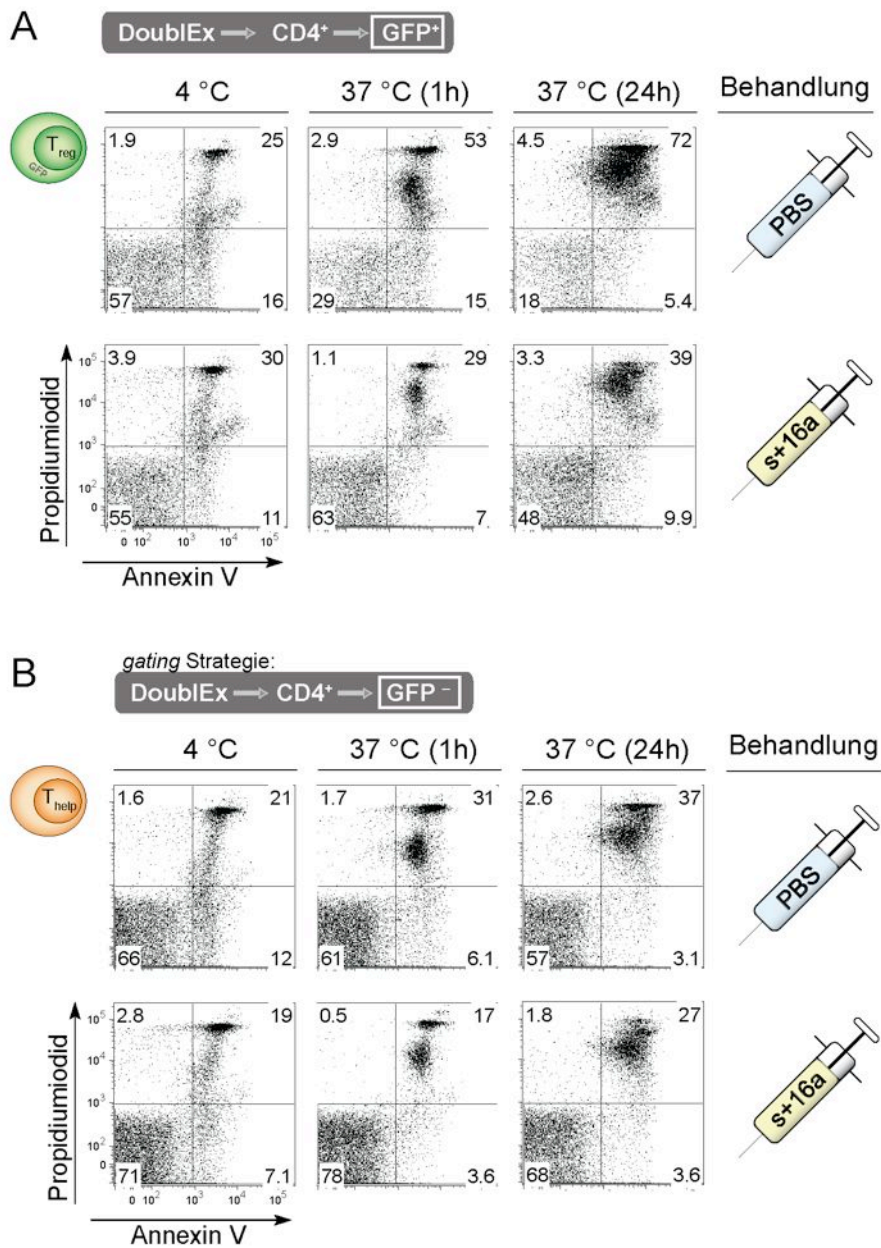


Abb 3.10: s+16a geschützte Tregs und Thelp zeigen bessere *in vitro* Überlebensraten als ungeschützte Zellen. Einer C57BL/6 DEREK Maus wurden 100 µg s+16a i.v. in 200 µl PBS gespritzt, einer weiteren C57BL/6 DEREK Maus wurden zur Kontrolle 200 µl PBS i.v. gespritzt. Beide Mäuse wurden 30 min post Injektion getötet und die Milzen und peripheren Lymphknoten entnommen. Nach der Aufbereitung der Zellen wurden die B Zellen mittels anti-Maus-Ig Dynabeads depletiert. Die überlebenden Zellen wurden in RPMI Medium (k) für 1 h bei 4 °C bzw. 1 - 24h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4, AnnexinV und Propidiumiodid angefärbt und der Vitalitätszustand der (A) Tregs und (B) Thelp durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

die Anfärbung mit AnnexinV und Propidiumiodid (PI) untersucht. Tote Zellen sind mit PI anfärbbar, da sie den Stoff aufnehmen und der in die DNA interkaliert. Lebende Zellen hingegen sind in der Lage, PI aus der Zelle hinaus zu schleusen. Durch die parallele Anfärbung mit AnnexinV ergeben sich die Kombination PI-AnnexinV⁻ für vitale, nicht-apoptotische Zellen; PI-AnnexinV⁺ für vitale, früh-apoptotische Zellen; sowie PI⁺AnnexinV⁺ für nicht-vitale, tote Zellen. Im folgenden werden somit sowohl PI-AnnexinV⁻ als auch PI-

AnnexinV⁺ zu den vitalen Zellen gerechnet. Betrachtet man die Vitalität der Tregs (CD4⁺GFP⁺), welche bei 4 °C auf Eis belassen und anschließend direkt analysiert wurden (Abb. 3.10A), so ist zu beobachten, dass sowohl bei den s+16a behandelten Mäusen als auch den Kontrolltieren ca. 70% der präparierten Tregs vital (PI⁻) waren. Wurden die Milzzellen für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, so waren nur noch 45% der Tregs, aus den PBS-behandelten Kontrollmäusen vital. Bei der mit s+16a behandelten Maus hingegen betrug der Anteil der vitalen Tregs weiterhin rund 70% (Abb. 3.10A). Wurde die Inkubationszeit auf 24h verlängert, so stieg der Anteil der toten Zellen deutlich an. Nur noch rund 25% der Tregs aus den PBS Kontrolltieren waren vital, bei den Tregs aus den s+16a behandelten Mäusen fanden sich hingegen noch rund 60% lebende Zellen wieder (Abb. 3.10A). Demnach betrug die relative Überlebensrate nach 24 h *in vitro* bei Tregs aus den PBS Kontrolltieren ca. 30% (relativ zu dem Anteil vitaler Zellen nach 1 h bei 4 °C), bei Tregs aus s+16a behandelten Tieren hingegen ca. 90%. Parallel zu den Tregs wurden auch die Thelp (CD4⁺GFP⁻) bezüglich Änderungen der Vitalität *in vitro* untersucht. Der Anteil toter Zellen war sowohl nach der Präparation (ca. 22%) als auch nach Inkubation bei 37 °C (40 %) deutlich kleiner als bei den Tregs. Die relative Überlebensrate betrug nach 24 h 37 °C Inkubation bei den Thelp aus den PBS Kontrolltieren 85% und bei den Thelp aus den s+16a behandelten Tieren 95% (Abb. 3.10B).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass das bei der Zellpräparation freigesetzte NAD einen erheblichen Einfluss auf die langfristige Vitalität von Tregs hat. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Injektion von s+16a vor Entnahme und Präparation der Milz diese Zellen weitgehend vor dem NAD-induziertem Zelltod schützen kann.

3.2.3 Bei der Zellpräparation freigesetztes NAD⁺ hemmt die Suppressorfunktion von Tregs

Eine der Hauptfunktionen der Tregs ist die Unterdrückung der Proliferation von Effektor T Zellen. *In vitro* kann die immunsuppressive Funktion der Tregs mittels eines *in vitro* T Zell Suppressionsversuches analysiert werden. Hierbei werden Tregs zusammen mit sogenannten *responder* T Zellen (Tresp) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und für mehrere Tage mit anti-CD3 und APCs bei 37 °C stimuliert. Durch die Stimulation werden die Tresp und Tregs aktiviert. Dies führt zur Proliferation der Tresp. Zeitgleich entfalten die aktivierten Tregs ihre immunsuppressive Wirkung und hemmen die Proliferation der Tresp. Wie stark die Tresp proliferieren ist somit direkt abhängig von der Menge und immunsuppressiven Aktivität der eingesetzten Tregs (siehe Einleitung 1.1.3.3). In vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass das bei der Zellpräparation freigesetzte NAD⁺ die Vitalität von Tregs aus WT Mäusen während einer 37 °C Inkubation vermindert.

Ob die immunsuppressive Funktion der Tregs durch die ADP-Ribosylierung während der Präparation und dem damit verbundenen Vitalitätsverlust beeinflusst wird, wurde in den folgenden Versuchen untersucht. Dazu wurde ein T Zellsuppressionsversuch mit GFP⁺ Tregs aus Milz und peripheren Lymphknoten von C57BL/6 DEREK WT, ART2ko und P2X7ko

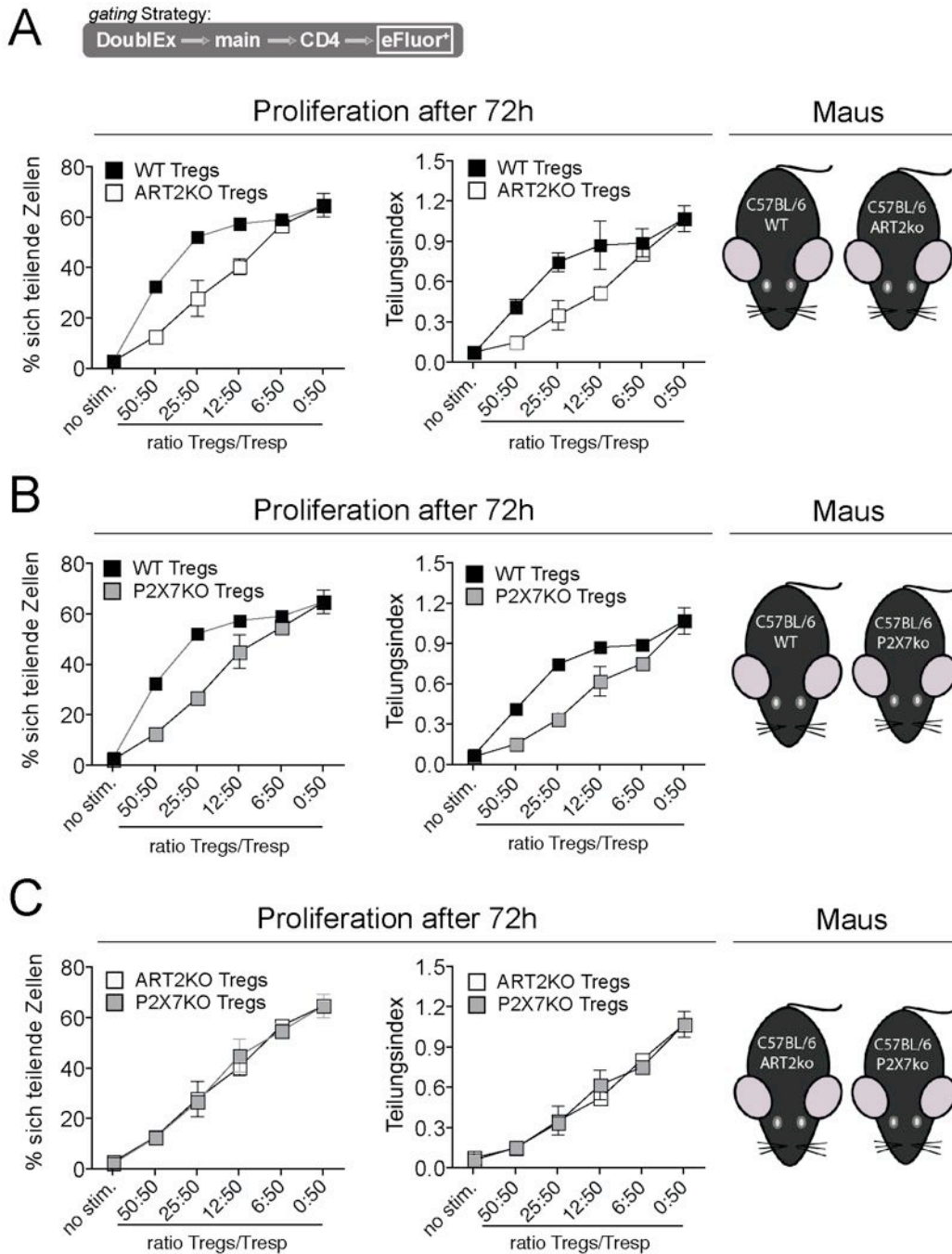


Abb 3.11: Das bei der Präparation freigesetzte NAD⁺ vermindert die immunsuppressive Kapazität von WT Tregs (aber nicht von ART2ko oder P2X7ko Tregs) im *in vitro* T Zell Suppressionsversuch.

Es wurden Milz- und Lymphknotenzellen von je drei C57BL/6 DREG WT, ART2ko und P2X7ko Mäusen präpariert. Nach Aufbereitung der Zellen wurden die B Zellen mittels anti-Maus-Ig Dynabeads depletiert und die verbleibenden Zellen zur durchflusszytometrischen Sortierung gegeben. Hier wurden GFP⁺ (Tregs) und GFP⁻ (Tresp) Zellen voneinander getrennt. Tresp aus ART2ko Mäusen wurden mit eFluor⁶⁷⁰ markiert und in RPMI Medium (k) resuspendiert um später mit Tregs aus WT, ART2ko oder P2X7ko Mäusen in bestimmten Verhältnissen kultiviert zu werden. 50.000 Tresp (ART2ko) wurden dabei mit einer abnehmenden Zahl an Tregs (50:50, 25:50, 12:50, 6:50 und 0:50) zusammen mit 200.000 APCs (aus einer PFPRAG-MM Maus) in RPMI Medium (k) mit 100 ng/ml anti-CD3 bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit anti-CD4 angefärbt und die Proliferation der CD4⁺GFP⁻ Tresp wurde über die Ausdünnung des eFluor⁶⁷⁰ gemessen. Dabei wurde die immunsuppressive Kapazität von WT und ART2 Tregs (A), WT und P2X7ko Tregs (B) sowie ART2ko und P2X7ko Tregs (C) anhand der Parameter „% proliferierende Zellen“ und „Teilungsindex“ (s. Abb. 2.4, Material und Methoden) miteinander verglichen (Dreifachbestimmung). Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Mäusen durchgeführt. Als Tresp wurden B Zell depletierte GFP⁻ Zellen aus ART2ko Mäusen verwendet. Die Tresp Zellen wurden mit dem fluoreszenten Farbstoff eFluor⁶⁷⁰ markiert und in bestimmten Verhältnissen mit Tregs zusammen unter CD3 Stimulation inkubiert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation der CD4⁺ Tresp Zellen über die Ausdünnung der eFluor⁶⁷⁰ Fluoreszenz gemessen. Die immunsuppressive Kapazität der Tregs wurde über zwei verschiedene Parameter bestimmt: „% sich teilende Zellen“ als Parameter für den prozentualen Anteil an Zellen, welche mindestens einen Teilungszyklus durchlaufen haben und den „Teilungsindex“ als Parameter für die mittlere Anzahl an Zellteilung aller CD4⁺ Tresp Zellen (Abb. 3.11 und Abb. 2.4).

Die Ergebnisse zeigen dass sowohl WT als auch ART2ko und P2X7ko Tregs konzentrationsabhängig die Proliferation der Tresp Zellen hemmen. Der Vergleich der drei Gruppen untereinander zeigt, dass WT Tregs eine wesentlich geringere immunsuppressive Kapazität aufweisen als ART2ko und P2X7ko Tregs (Abb. 3.11A/B). So proliferierten 30% der Tresp Zellen, wenn sie im Verhältnis von 50:50 mit WT Tregs inkubiert wurden. Inkubierte man stattdessen ART2ko und P2X7ko Tregs mit Tresp im Verhältnis 50:50, so proliferierten hingegen nur 10% der Tresp Zellen. In Abwesenheit von Tregs proliferierten 60% der Tresp. Auch die Berechnung des Teilungsindex zeigt, dass WT Tregs beim Verhältnis 50:50 (0,4 Teilungen) eine geringere suppressive Kapazität besitzen als ART2ko und P2X7ko Tregs (0,1 Teilungen). Der maximale Teilungsindex in Abwesenheit von Tregs (0:50) betrug 1,0. Der Vergleich von ART2ko und P2X7ko Tregs bezüglich ihrer Immunsuppressivität zeigte einen nahezu deckungsgleichen Kurvenverlauf bei beiden Parametern (Abb. 3.11C).

Die Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass die ADP-Ribosylierung von P2X7 als Reaktion auf das während der Präparation freigesetzte NAD⁺ sich negativ auf die *in vitro* Suppressorfunktion von Tregs auswirkt.

3.2.4 Die Blockade der präparationsbedingte ADP-Ribosylierung von P2X7 auf Tregs durch s+16a bewahrt die Suppressorfunktion der Tregs aus WT und CD38ko Mäusen

Die im letzten Abschnitt gezeigten Ergebnisse deuten an, dass die ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Zellpräparation nachhaltige Auswirkungen auf die Suppressorfunktion von Tregs hat. Da die präparationsbedingte Aktivierung von P2X7 durch die Injektion des ART2-blockierenden Nanobodies s+16a verhindert werden konnte (Abb. 3.9 & 3.10), stellte sich die Frage, ob dadurch auch die Suppressorfunktion von Tregs bewahrt werden könnte.

Da Tregs aus CD38ko Mäusen offensichtlich besonders empfindlich auf freigesetztes NAD reagieren (Abb. 3.8), wurde die mögliche schützende Wirkung des s+16a Nanobodies vergleichend mit WT und mit CD38ko Mäusen untersucht (Abb. 3.12). Es wurden hierfür jeweils drei C57BL/6 DEREK WT und C57BL/6 DEREK CD38ko Mäuse mit je 100 µg s+16a i.v. vorbehandelt. Als Kontrollen wurde je drei WT und CD38ko Tieren 200 µl PBS injiziert. 30 min nach der Nanobody Injektion wurden GFP⁺ Tregs aus Milz und peripheren

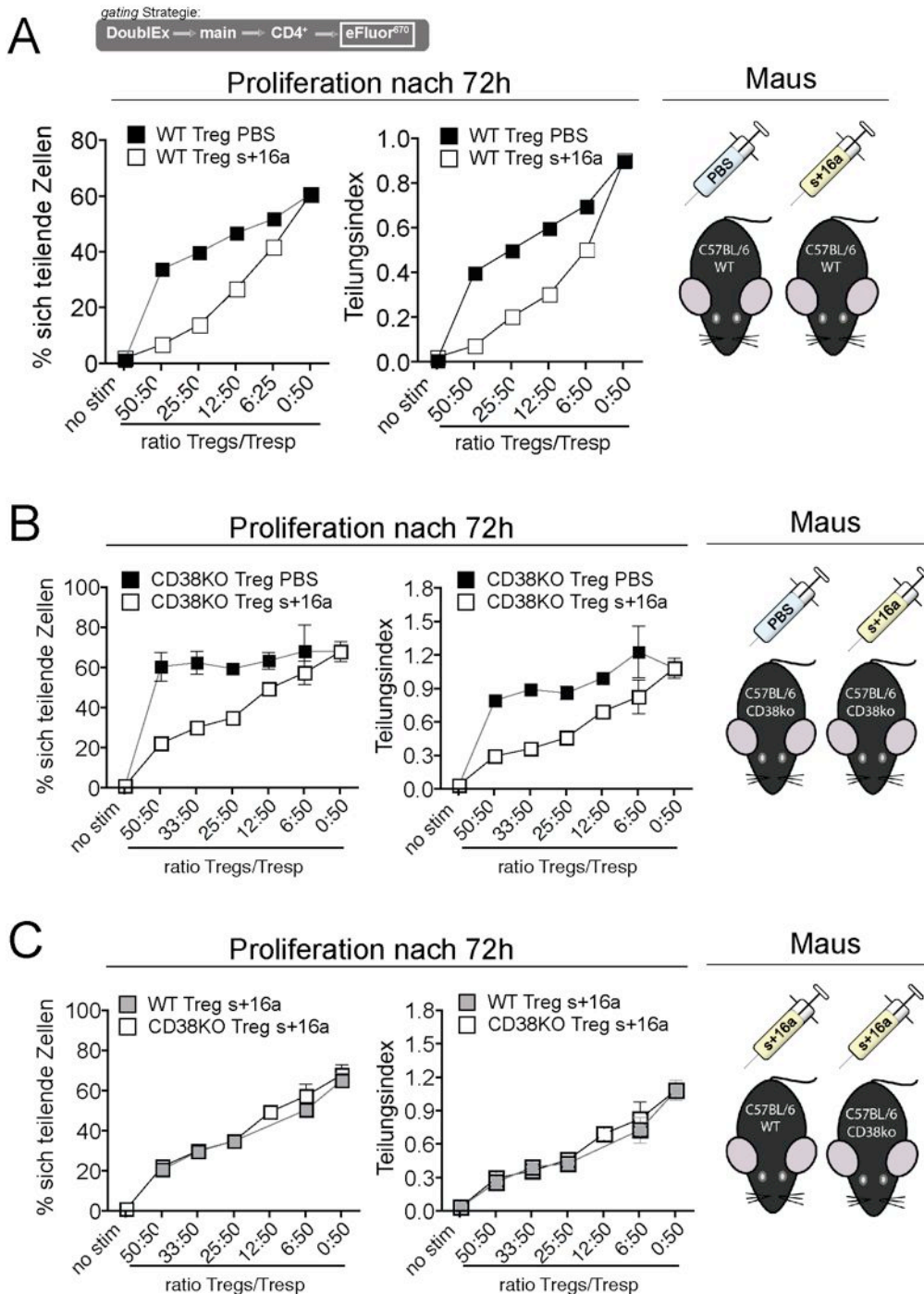


Abb 3.12: Eine intravenöse Injektion des ART2-blockierenden Nanobodies s+16a bewahrt die immunsuppressive Kapazität von WT und CD38ko Tregs im *in vitro* T Zell Suppressionsversuch. Je drei C57BL/6 DEREG WT (A) und CD38ko (B) Mäusen wurden 100 µg s+16a in 200 µl PBS i.v. gespritzt, drei weiteren C57BL/6 DEREG WT (A) und CD38ko (B) Mäusen wurden zur Kontrolle 200 µl PBS i.v. gespritzt. Alle Mäuse wurden 30 min post Injektion getötet und die Milzen und peripheren Lymphknoten entnommen. Nach der Aufbereitung der Zellen wurden die B Zellen mittels anti-Maus-Ig Dynabeads depletiert und die verbleibenden T Zellen zur durchflusszytometrischen Sortierung gegeben. Hier wurden GFP⁺ (Tregs) und GFP⁻ (Tresp) Zellen voneinander getrennt. Tresp (aus den s+16 behandelten WT Mäusen) wurden mit eFluor⁶⁷⁰ markiert und in RPMI Medium (k) resuspendiert um später mit Tregs in bestimmten Verhältnissen weiter inkubiert zu werden. 50.000 Tresp wurden mit einer abnehmenden Zahl an Tregs (50:50, 25:50, 12:50, 6:50, ohne) und mit 200.000 APCs (aus einer PFPRAG-MM Maus) in RPMI Medium (k) mit 100 ng/ml anti-CD3 bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit anti-CD4 angefärbt und die Proliferation der CD4⁺GFP⁻ Tresp wurde wie in Abb. 3.11 über die Ausdünnung des eFluor⁶⁷⁰ gemessen. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Lymphknoten mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert. Als Tresp Zellen wurden B Zell depletierte GFP-negative Zellen aus s+16-injizierten WT Tieren verwendet. Die Suppressorfunktion der Tregs wurde wie zuvor in einem T Zell Suppressionsversuchs (Abb. 3.11) evaluiert. Die Ergebnisse bestätigen, dass ungeschützte WT Tregs die Proliferation von CD4⁺ Tresp Zellen konzentrationsabhängig, aber schwach inhibieren (Abb. 3.12A). Wird die ADP-Ribosylierung jedoch während der Präparation durch die Injektion von s+16a verhindert, so verbessert sich die immunsuppressive Kapazität der WT Tregs deutlich (Abb. 3.12A). Bei einer Treg/Tresp Ratio von 50:50 finden sich bei ungeschützten Tregs noch ca. 35% proliferierende Tresp Zellen mit einem Teilungsindex von 0,4. Bei Tregs aus s+16a behandelten Mäusen proliferieren hingegen nur ca. 5% der Tresp Zellen mit einem Teilungsindex von weniger als 0,1. Unter den gleichen Bedingungen sind Tregs aus PBS-behandelten CD38ko kaum in der Lage, die Proliferation der Tresp zu unterdrücken (Abb. 3.12B). So liegt der prozentuale Anteil proliferierender Tresp Zellen bei maximaler eingesetzter Menge an CD38ko Tregs (50:50) mit ca. 60% etwa auf gleichem Niveau wie bei dem Inkubationsansatz ohne Tregs (0:50). Auch der Teilungsindex fällt mit 0,8 bei maximaler eingesetzter Menge an CD38ko Tregs (50:50) nur unwesentlich geringer aus, als bei dem Ansatz ohne Tregs (0,9) (Fig. 3.12B). Tregs aus CD38ko Mäusen, die während der Präparation durch die injizierten s+16a Nanobodies geschützt waren, konnten, ähnlich wie die s+16a geschützte WT Tregs, konzentrationsabhängig die Proliferation der Tresp unterdrücken. So ist der prozentuale Anteil proliferierender Tresp Zellen bei maximaler eingesetzter Menge an Tregs aus s+16a behandelten CD38ko Mäusen (50:50) mit 20% deutlich geringer als bei dem Inkubationsansatz ohne Tregs (60%). Ebenso ist der Teilungsindex mit 0,3 bei maximaler eingesetzter Menge an CD38ko Tregs (50:50) deutlich geringer als bei dem Ansatz ohne Tregs (Fig. 3.12B). Der direkte Vergleich von Tregs aus s+16a vorbehandelten WT und CD38ko Mäusen zeigt dass beide ähnlich effizient wie Tregs aus ART2ko und P2X7ko Mäusen (Abb. 3.11C) die Proliferation der Tresp inhibieren (s. die ähnlichen Kurvenverläufe bei den Parametern „%proliferierende Zellen“ und „Teilungsindex“ Abb. 3.12C)

Die Ergebnisse zeigen somit, dass durch eine Vorbehandlung mit dem Nanobody s+16a die Suppressorkapazität von sowohl WT als auch CD38ko Tregs deutlich erhöht werden kann. Ferner geht aus diesen Experimenten hervor, dass ungeschützte WT und CD38ko Tregs die Proliferation von Tresp unterschiedlich stark inhibieren, s+16a geschützte WT und CD38ko Tregs hingegen vergleichbar gut die Proliferation der Tresp unterdrücken.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T Zellen während der Zellpräparation mit NAD⁺ in Kontakt kommen und dass dieses die Funktion der Tregs beeinflusst. Dieser Effekt wird offensichtlich über ART/P2X7 vermittelt, da ART2ko und P2X7ko Tregs resistent gegenüber bei der Zellpräparation freigesetztem NAD⁺ sind (Abb. 3.8, 3.11). Ca. 50% der Tregs aus WT Mäusen hingegen reagieren mit der Externalisierung von PS, wenn sie bei 37 °C inkubiert werden (Abb. 3.8, 3.10). Diese NAD-vermittelten Effekte sind bei

Tregs aus CD38ko Mäusen deutlicher sichtbar (Abb. 3.8, 3.12), da diesen Mäusen das wichtigste NAD abbauende ecto-Enzym (CD38) fehlt. NAD⁺ vermittelte-Effekte im Rahmen der Zellpräparation lassen sich durch die Vorbehandlung der Mäuse mit dem ART2-blockierenden Nanobody s+16a verhindern (Abb. 3.9, 3.10, 3.12). Dies führt dazu, dass die Vitalität der CD4⁺ T Zellen, insbesondere der Tregs, bei längerer Inkubationsdauer deutlich besser erhalten bleibt als bei Zellen aus unbehandelten Kontrolltieren. Dass das bei der Zellpräparation freigesetzte NAD und die daraus folgende NAD-abhängige ADP-Ribosylierung von P2X7 Auswirkungen auf die Funktion von Tregs hat, konnte anhand von *in vitro* T Zell Suppressionsversuchen gezeigt werden (Abb. 3.11). So können WT und CD38ko Tregs die Proliferation von Tresp schlechter inhibieren als ART2ko oder P2X7ko Tregs. Wird die ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Präparation durch die Vorbehandlung mit dem ART2 blockierenden Nanobody s+16a unterbunden, so wird die Suppressorkapazität von WT und CD38ko Tregs erheblich verbessert.

3.3 *In vivo* Manipulation von Tregs durch NAD⁺ Injektion und funktionelle Analyse der Auswirkung anhand des B16 Tumor Mausmodells

Aus den bisher vorgestellten Ergebnissen geht hervor, dass Tregs eine höhere Sensitivität gegenüber extrazellulärem NAD⁺ aufweisen als Thelp und dass selbst geringe Mengen NAD⁺, die bei der Zellpräparation freigesetzt werden, die Suppressor Funktion von Tregs beeinträchtigen. Diese selektive inhibierende Wirkung von NAD⁺ auf Tregs wirft die Frage auf, ob NAD⁺ pharmakologisches Potenzial für die Hemmung von Tregs *in vivo* besitzen könnte. Dieses könnte beispielsweise wünschenswerte Folgen für die Immunabwehr von Tumoren haben. So beschreiben Klages *et al.* 2010, dass eine gezielte Depletion von Tregs *in vivo* bzw. eine Verschiebung des Treg/Teff Gleichgewichts zugunsten von Teff bei verschiedenen Tumor Mausmodellen zur Verlangsamung des Tumorwachstums oder gar zur Tumorregression führt. Vermutlich können Effektor T Zellen bei reduzierten Tregs eine effektivere anti-Tumor Immunantwort aufrechterhalten (Klages *et al.*, 2010).

Die folgenden Experimenten adressieren deshalb die folgenden Fragen: Lässt sich das Treg/Teff Gleichgewicht *in vivo* durch eine NAD Injektion zu Gunsten der Effektor T Zellen verschieben und kann damit ggf. eine effektivere Kontrolle des Tumorwachstums in einem Mausmodell erzielt werden?

3.3.1 Die Injektion von NAD⁺ führt zu einer relativen Abnahme von Tregs *in vivo*

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass Injektionen von NAD⁺ in B6 und Balb/c Mäusen zu einer Abnahme von T Zellen *in vivo* führt (Liu *et al.*, 2001; Adriouch *et al.*, 2007). Da der Unterschied in der NAD⁺ Sensitivität von Tregs und Thelp bei B6 Mäusen höher ist als bei Balb/c Mäusen (Abb. 3.7) wurden die folgenden Untersuchungen mit B6 Mäusen durchgeführt. Daraus ergibt sich die Frage, ob Tregs aus C57BL/6 Mäusen, welche weitaus empfindlicher auf NAD⁺ reagieren als Thelp (siehe Abb. 3.3-4), gezielt durch eine NAD⁺ Injektion *in vivo* manipuliert werden können.

Zur Überprüfung der Frage ob NAD⁺ Injektionen bevorzugt Tregs eliminieren, wurden sowohl C57BL/6 DEREK WT Mäuse und C57BL/6 DEREK CD38ko Mäuse verwendet. Da CD38ko Mäuse NAD⁺ *in vivo* langsamer hydrolysieren als WT Mäuse (Krebs *et al.*, 2005), wurden diese Tiere mit geringeren NAD⁺ Dosen als WT Mäuse behandelt (10 mg bzw. 60 mg in 200 µl PBS i.v.). Als Negativkontrolle dienten Mäuse, denen nur PBS verabreicht wurde. Zur Analyse des NAD⁺ vermittelten Effekts wurden 20 h nach NAD⁺ Injektion Zellen aus Milz und Lymphknoten isoliert und der relative Anteil von CD8⁺ zytotoxischen T Zellen (CTL), CD4⁺ T Helferzellen (Thelp) und CD4⁺/GFP⁺ regulatorischen T Zellen (Tregs) ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen sowohl bei CD38ko Mäusen (Abb. 3.13A) als auch bei WT Mäusen (Abb. 3.13B) eine starke Verminderung des Anteils der GFP⁺ Tregs innerhalb der Population

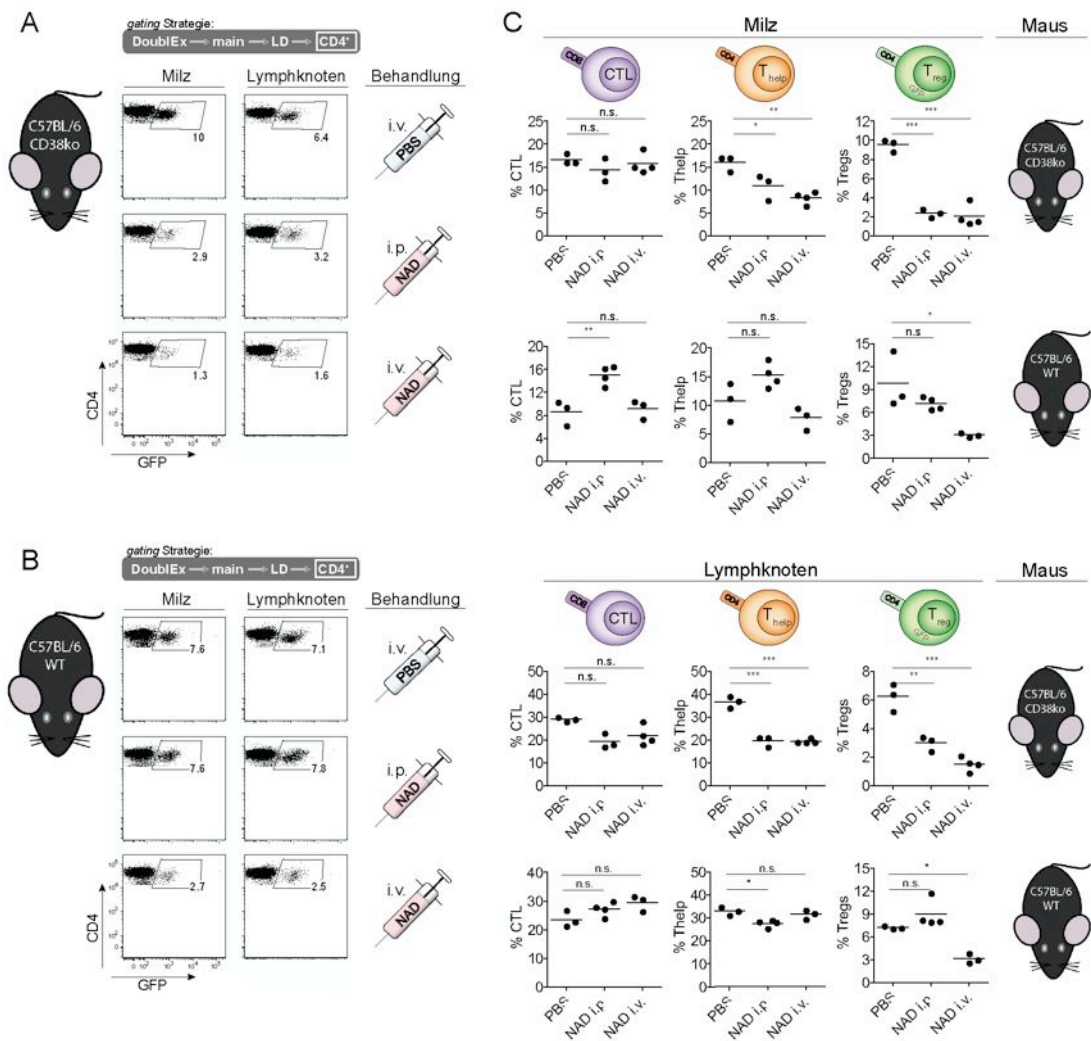


Abb 3.13: Die Injektion von NAD⁺ vermindert das Verhältnis von Tregs zu Effektor T Zellen in C57BL/6 WT und CD38ko DEREK Mäusen.

CD38ko (A) und WT (B) C57BL/6 DEREK Mäusen wurden je 10 mg (A) bzw. 60 mg NAD⁺ (B) in 200 µl PBS i.v. (n = 4), i.p. (n = 3) oder 200 µl PBS i.v. (n = 3) gespritzt. Nach 20 Stunden wurden Zellen aus Milz und peripheren Lymphknoten präpariert und nach Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und CD8 mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A, B) Repräsentative FACS plots der CD4 positiven Zellen. Die Zahlen zeigen den Anteil von Tregs (GFP⁺) bezogen auf die CD4⁺ Population. (C) Ermittelt wurde der Anteil von CD8⁺ Zellen (CTL) und CD4⁺ Zellen (Thelp), jeweils bezogen auf die Gesamtzahl der vitalen Lymphozyten (wie in Abb. 3.3 definiert über FSC vs. SSC und FSC vs. LD), sowie der Anteil von Tregs (GFP⁺) Zellen bezogen auf die CD4⁺ Zellpopulation. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test, p-Werte <0.05 = *, <0,01 = **, <0,001 = ***, n.s. = nicht signifikant

der CD4⁺ T Zellen 24 h nach intravenöser Injektion von NAD⁺ (Abb. 3.13A). Dieser Effekt war sowohl in der Milz als auch in den peripheren Lymphknoten zu beobachten. Die Reduktion der Tregs war nach intraperitonealer Applikation bei CD38ko Mäusen etwas, und bei WT Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt als nach intravenöser Applikation. Neben der relativen Abnahme der Tregs innerhalb der CD4⁺ T Zellpopulation war bei CD38ko Mäusen ferner eine relative Abnahme der CD4⁺ T-Zellen gegenüber CD8⁺ T-Zellen zu festzustellen. Dieser relative Abfall von CD4⁺ Zellen war bei WT Mäusen nicht oder nur abgeschwächt zu beobachten (Abb. 3.13C).

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigt, dass die Injektion von NAD⁺ in C57BL/6 Mäusen in der Tat das Verhältnis von Tregs/Thelp zugunsten von Thelp verschiebt. Da die intravenöse NAD Injektion eine selektivere Wirkung auf Tregs zeigte, wurde diese Applikationsroute für die nachfolgenden Tumor Experimente mit C57BL/6 WT Mäusen gewählt.

3.3.2 B16 Tumore in NAD⁺ behandelten Mäusen zeigen ein vermindertes

Wachstum

Die im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die intravenöse Verabreichung von NAD⁺ das Treg/Teff Gleichgewicht zugunsten der Effektor T Zellen verschiebt, ähnlich wie dies nach Injektion des anti-CD25 Antikörpers PC-61 beobachtet wurde. Die PC-61-vermittelte Verschiebung des Treg/Teff Gleichgewichts zeigte in verschiedenen Tumor Mausmodellen einen therapeutischen Effekt, der sich durch ein langsames Tumorwachstum äußerte (Onizuka *et al.*, 1999).

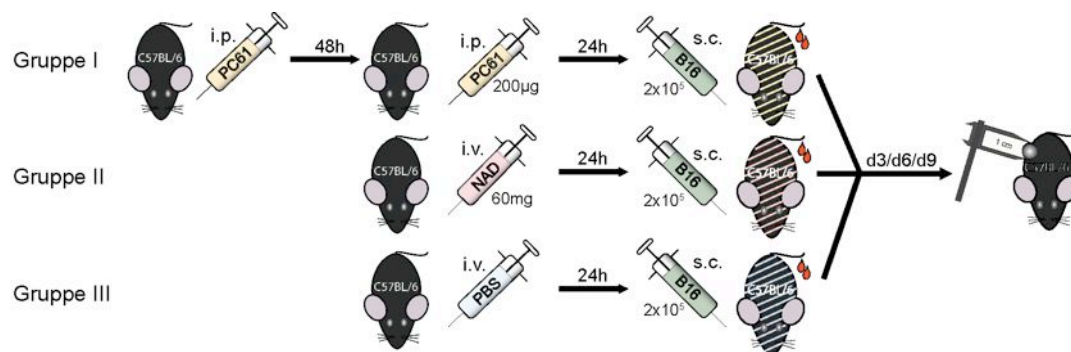


Abb. 3.14: Schematische Darstellung des experimentellen Prozedere des B16 Tumor Mausmodells. Eine Kohorte von C57BL/6 Mäusen wurde in drei Gruppen geteilt. Gruppe I (n = 12): Injektion von je 200 µg PC61 (anti-CD25) i.p. 72 h und 24 h vor Injektion der B16 Tumorzellen. Gruppe II (n = 14): Injektion von 60 mg NAD i.v. 24 h vor Injektion der B16 Tumorzellen. Gruppe III (n = 18): Injektion von 200 µl PBS 24 h vor Injektion der B16 Tumorzellen. Am Tag der B16 Tumorzellen Implantation (Tag 0) wurde allen Tieren 1-2 Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und anschließend 2×10^5 B16 Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke injiziert. 12 Tage nach Injektion der Tumorzellen wurde jeweils ein Teil der Tiere (n=6) getötet, um die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten durchflusszytometrisch zu analysieren. Die Tumorgöße wurde über einen Zeitraum von maximal 28 Tagen gemessen.

Daraus ergibt sich die Frage, ob durch die Injektion von NAD ähnliche therapeutische Effekte erzielt werden können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das murine B16 Melanom Tumormodell verwendet. Abbildung 3.14 veranschaulicht das an drei Gruppen von C57BL/6 WT Mäusen durchgeführte experimentelle Prozedere (Abb. 3.14). In Gruppe I wurden den Mäusen im Abstand von zwei Tagen 200 µg PC-61 i.p. injiziert, in Gruppe II wurde den Mäusen 60mg NAD in 200 µl PBS i.v. gespritzt und in Gruppe III erhielten die Tiere zur Kontrolle eine einmalige PBS i.v. Injektion. 24 h später wurde den Mäusen Blut entnommen um die Frequenz der Tregs im peripheren Blut zu analysieren. Anschließend wurde den Tieren je 2×10^5 B16 Melanomzellen subkutan (s.c.) in die rechte Flanke injiziert. Das Wachstum der Tumoren wurde über einen Zeitraum von maximal 28

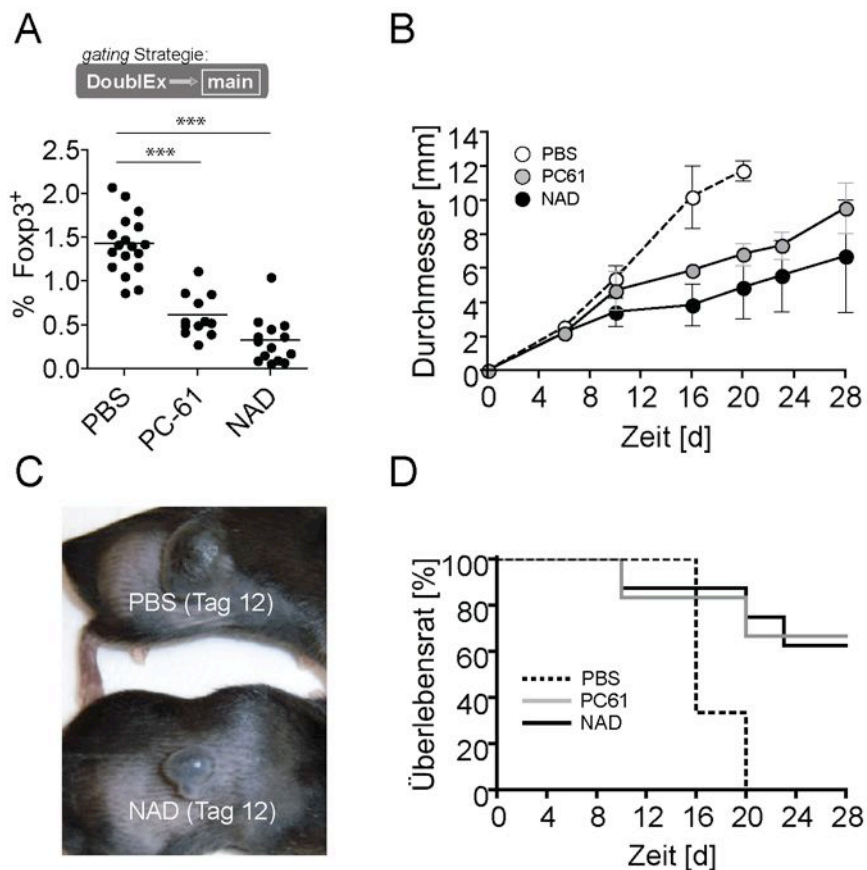


Abb. 3.15: NAD⁺ Injektionen führen zu einem verlangsamteten Tumorwachstum.

(A) Zur Überprüfung der zirkulierenden Tregs nach Injektion von NAD⁺ und PC61 wurden die an Tag 0 gewonnene Blutproben von Erythrozyten befreit und die restlichen Zellen fixiert. Nach Färbung mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen Foxp3 wurde der Anteil der Tregs (Foxp3⁺) bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten (definiert wie in Abb. 3.1 über FSC vs. SSC) ermittelt. Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test, p-Werte < 0,001 = ***. (B) Der mittlere Durchmesser der Tumoren wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen bei allen drei Gruppen gemessen. (C) An Tag 12 wurden je 6 Tiere pro Gruppe getötet, die Tumoren entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. (D) Die Überlebensrate in den drei Gruppen wurde bestimmt. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Tagen gemessen. Abbruchkriterien waren ein mittlerer Tumordurchmesser von mehr als 1 cm oder eine Perforation des Tumors durch die überliegende Haut aufgrund schnellen Tumorwachstums. Wurden die Abbruchkriterien erfüllt, so wurde die Maus getötet.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der peripheren Blut Zellen am Tag der Tumorzellinjektion (Tag 0) zeigte eine deutliche relative Abnahme der Foxp3⁺ Tregs im peripheren Blut sowohl bei den PC61 als auch bei den NAD behandelten Mäusen (Abb. 3.15A). Das Wachstum der Tumoren wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen überwacht. Ab Tag 6 zeigten die drei Gruppen deutliche Unterschiede im Wachstum der Tumore (Abb. 3.15B). Dabei wuchsen die Tumore in NAD⁺ und PC61 behandelten Mäuse deutlich langsamer als die Tumoren in PBS Kontrolltieren (Abb. 3.15 B, C). Dies spiegelt sich auch in der deutlich höheren Überlebensrate der PC61 und der NAD⁺ behandelten Mäuse, die bei Versuchende (Tag 28) noch über 60% lag. In der Gruppe der PBS Kontrolltiere hingegen mussten alle Tiere bis Tag 20 aufgrund der Erfüllung der Abbruchkriterien getötet werden (Abb. 3.15D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine einmalige NAD⁺ Injektion eine Verschiebung des Treg/ Teff Gleichgewichts zugunsten der Teff bewirkt und einen therapeutischen Effekt im B16 Tumor Mausmodell hat. Die durch NAD-Injektion erzielten Effekte waren sogar noch stärker als die der klassischen Antikörper-basierten Therapie, sowohl in Bezug auf ein langsames Tumorwachstum als auch in Bezug auf eine höhere Überlebensrate.

3.3.3 Tumor-infiltrierende Effektor T Zellen in NAD⁺ behandelten Mäusen zeigen einen aktivierten Phänotyp

Die Injektion von NAD⁺ verschiebt das Treg/ Teff Verhältnis zugunsten der Teff und führt im B16 Modells zu langsamerem Tumorwachstum. Um zu prüfen, ob die NAD-vermittelte Abnahme der Tregs einhergeht mit einer effektiveren anti-Tumorimmunantwort wurden einige Tiere an Tag 12 Tiere getötet um die tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) durchflusszytometrisch zu analysieren. Die Ergebnisse zeigen unter den TILs bei PBS Kontrollmäusen ein ausgewogenes Verhältnis von CD8a⁺ zu CD4⁺ T Zellen (1:1) (Abb. 3.16B), bei NAD behandelten Tiere jedoch ein deutlich höheres CD8a⁺ zu CD4⁺ T Zellen Verhältnis (2:1). Den CD8a⁺ T Zellen werden direkte anti-Tumor Effektorfunktion zugeschrieben (Chen *et al.*, 2005). Um den Aktivitätszustand der CD8⁺ Zellen zu überprüfen wurde die Expression des zytotoxischen Effektormoleküls Granzym B und des Aktivierungsmarkers CD44 analysiert (Abb. 3.16B). CD8a⁺ T Zellen aus den Tumoren von NAD⁺ behandelten Mäusen zeigten einen deutlich höheren Anteil an Granzym B⁺ Zellen als CD8a⁺ T Zellen aus den Tumoren von PBS Kontrolltieren (Abb. 3.16A/B). Ebenso wiesen sowohl CD8a⁺ als auch CD4⁺ TILs aus NAD⁺ behandelten Mäusen eine höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD44 auf als die TILs aus PBS Kontrollmäusen (Abb. 3.16A,B).

Die Ergebnisse dieses Abschnitts sind kompatibel mit folgenden kausalen Zusammenhang: Die Injektion von NAD führt bevorzugt zur Abnahme von Tregs *in vivo*, dadurch verschiebt sich das Treg/ Teff Gleichgewicht und die Teff überwiegen. Dies wiederum ermöglicht die Etablierung einer effektiveren anti-Tumorimmunantwort, die andernfalls in Gegenwart von Tregs geschwächt wäre. Die effektivere anti-Tumorimmunantwort äußert sich in einer verstärkten Infiltration bzw. lokalen Vermehrung aktivierter CD8⁺ zytotoxischer T Zellen, die z.B. über die Sekretion von Granzym B Tumorzellen effektiver abtöten. Dies trägt zu dem langsamerem Tumorwachstum bei NAD⁺ und PC61 behandelten Mäusen bei. Somit könnte die Aktivierung des ART2/P2X7 Signalweges auf Tregs über die intravenöse Injektion von NAD⁺ eine wirkungsvolle Alternative zu Antikörper-basierten Protokollen der *in vivo* Manipulationen von Tregs darstellen.

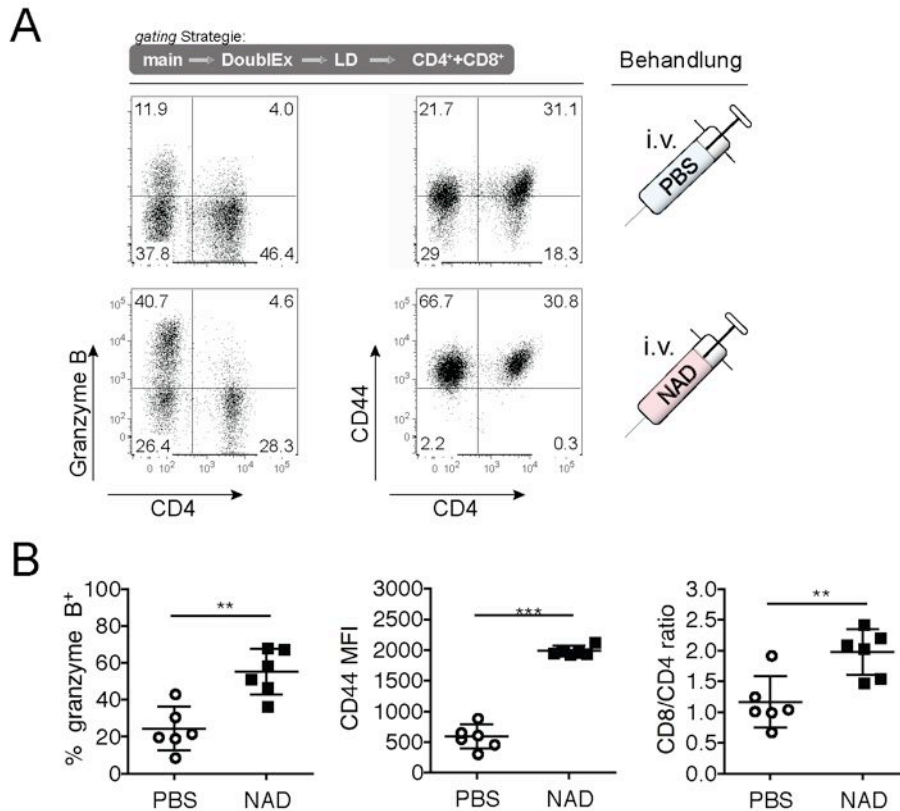


Abb. 3.16: NAD-Injektionen führen zu einem höheren Anteil von Granzym B⁺ und CD44⁺ Zellen bei Tumor-infiltrierenden Lymphozyten.

An Tag 12 nach der Tumorimplantation wurden je 6 Mäuse pro Gruppe getötet und die Tumore präpariert und in kleine Stücke geschnitten. Nach Behandlung mit Kollagenase für 1 h bei 37°C wurden Zellen sanft resuspendiert und die infiltrierenden Lymphozyten über einen Percoll Gradienten aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD8, anti-CD4 und anti-CD44 gefärbt, danach gewaschen, fixiert, permeabilisiert und mit anti-Granzyme B angefärbt. (A) Repräsentative FACS plots der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Die Zahlen zeigen den Anteil der Zellen in dem jeweiligen Quadranten bezogen auf die Gesamtzahl der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. (B) Ermittelt wurde der Anteil von Granzym B⁺ Zellen bezogen auf die Zahl der CD8⁺ Zellen, die mittlere Fluoreszenzintensität der anti-CD44 gefärbten CD8⁺ Zellen, sowie das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺ Zellen. Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Statistik: students t-Test, p-Werte < 0,01 = ** , < 0,001 = ***

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass regulatorische T Zellen (Tregs) empfindlicher auf extrazelluläres NAD⁺ reagieren als T Helferzellen (Thelp). NAD⁺ Konzentrationen im Bereich von 1 - 5 μ M NAD⁺ induzieren bei > 50% der Tregs die P2X7- und ART2-abhängige Externalisation von Phosphatidylserin (PS) sowie die Abspaltung von CD27 und CD62L von der Zelloberfläche. Bereits während der Zellpräparation werden ausreichende Mengen NAD⁺ freigesetzt, um P2X7 auf der Mehrzahl von Tregs zu aktivieren. Diese ART2-abhängige Modifikation während der Präparation beeinträchtigt die Vitalität und Suppressor Funktion von Tregs in folgenden Inkubationen bei 37 °C. Die Injektion eines ART2-blockierenden Nanobodies. Die hohe NAD⁺ Sensitivität von Tregs eröffnet die Möglichkeit, diese gezielt durch die Injektion von NAD⁺ in ihrer Funktion *in vivo* zu beeinflussen. In der Tat konnten NAD⁺ Injektionen das Gleichgewicht von Tregs zu Effektor T Zellen (Teff) zugunsten von Teff verschieben. Dies ermöglichte eine effizientere Tumorkontrolle im B16 Maus Tumormodell.

Die Diskussion in den folgenden drei Abschnitten widmet sich 1. der möglichen Ursache und funktionellen Bedeutung der hohen NAD⁺ Sensitivität von Tregs *in vivo*, 2. den Konsequenzen dieser Modifikation für funktionelle Untersuchungen mit präparierten Tregs *in vitro* sowie dem möglichen Schutz der Tregs vor NAD⁺ durch ART2-blockierenden Nanobodies, und 3. den möglichen Auswirkungen von pharmakologischen NAD⁺ Applikationen *in vivo*.

4.1 Mögliche Ursache und funktionelle Bedeutung der hohen NAD⁺ Sensitivität von Tregs

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass Tregs empfindlicher auf extrazelluläres NAD⁺ reagieren als Thelp. Die Beobachtung, dass Tregs aus ART2ko und P2X7ko Mäusen nicht auf NAD⁺ reagieren deutet dabei auf eine entscheidende Rolle dieser beiden Membranproteine. Expressionsanalysen zeigen, dass Tregs deutlich mehr P2X7 auf der Zelloberfläche, aber ähnliche oder nur geringfügig höhere Mengen an ART2 exprimieren als Thelp. Einhergehend damit zeigen Tregs im Vergleich mit Thelp auf extrazelluläres NAD⁺ stärkere und schnellere Calcium Signale, PS-Externalisation und Abspaltung von CD27 und CD62L (Abb. 3.3-6). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das Expressionsniveau von P2X7 die NAD⁺ Sensibilität der Tregs mit bestimmt. Dass auch die ART2 Expression von Bedeutung ist, zeigen die Ergebnisse aus den vergleichenden Untersuchungen von Tregs aus verschiedenen Mausstämmen. So reagieren Balb/c und DBA/1 Tregs, die deutlich weniger ART2 auf der Zelloberfläche exprimieren, schwächer auf NAD⁺ als C57BL/6 Tregs. Es ist darüber hinaus denkbar, dass bekannte allele Mutationen von ART2: G20S (B6), L32M (DBA), I95K (BALBc), E218Q (BALBc), N226E (DBA) (Koch-Nolte *et al.*, 1995; Koch-Nolte *et al.*, 1999) und von P2X7: P451L (B6) (Adriouch *et al.*, 2002) in diesen Mausstämmen die NAD-Sensitivität mit beeinflussen.

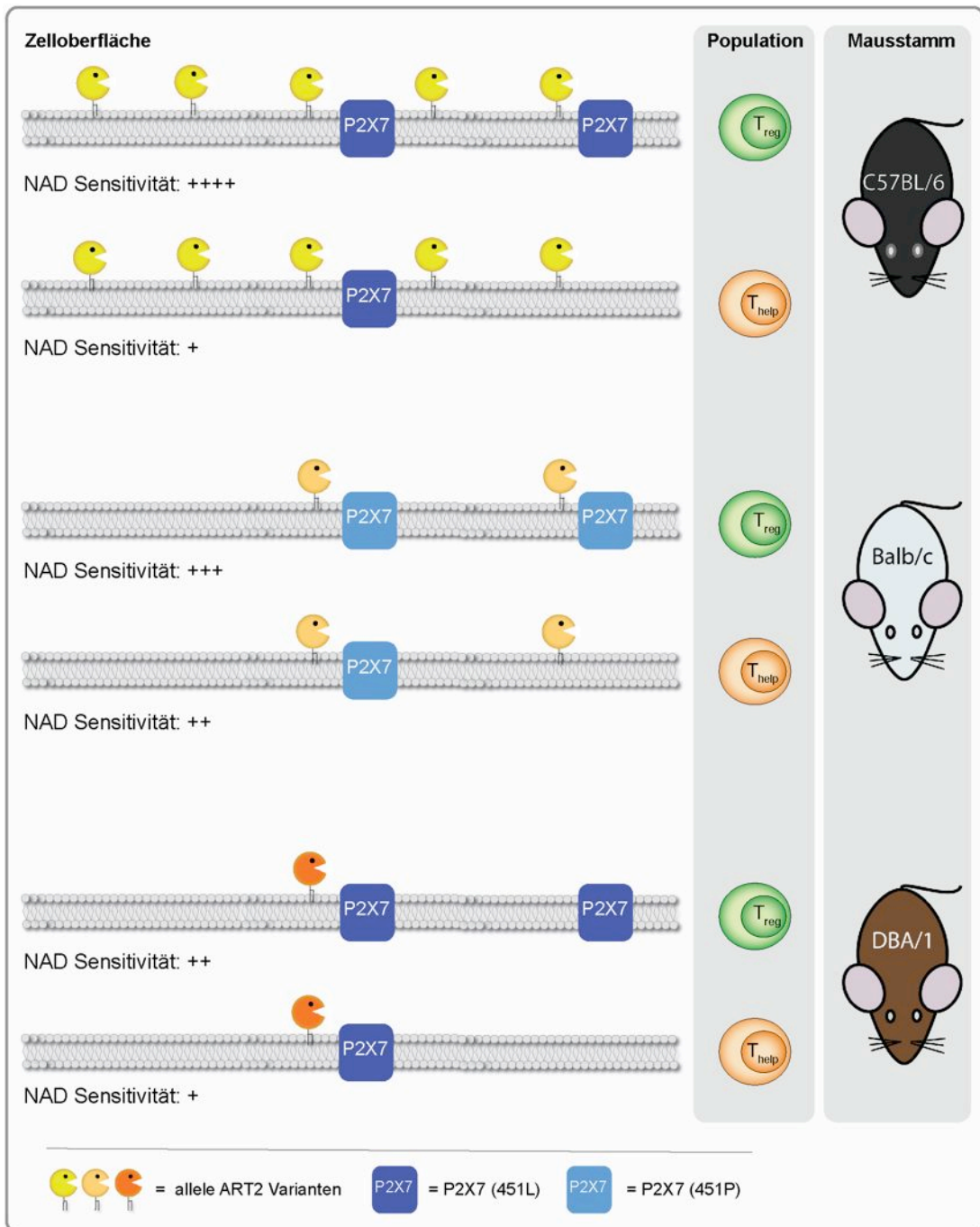


Abb. 4.1: Eine hohe Expression aktiver alleler Varianten von ART2 und P2X7 begünstigt die NAD⁺ Sensitivität von Tregs

Tregs aus C57BL/6 Mäusen exprimieren viel ART2 (20S Variante), viel P2X7 (451L Variante) und reagieren sehr empfindlich auf NAD⁺, Thelp aus diesen Mäusen exprimieren viel ART2 aber nur wenig P2X7 und reagieren kaum auf NAD⁺. Tregs aus Balb/c Mäusen exprimieren wenig ART2 (95K/218Q Variante) aber viel P2X7 (451P Wildtyp) und reagieren mäßig stark auf NAD⁺, Thelp aus diesen Mäusen exprimieren wenig ART2 und wenig P2X7 und reagieren mäßig auf NAD⁺. Tregs aus DBA/1 Mäusen exprimieren wenig ART2 (32M/266E Variante), aber viel P2X7 (451L Variante) und reagieren mäßig auf NAD⁺, Thelp aus diesen Mäusen exprimieren wenig ART2 und wenig P2X7 und reagieren kaum auf NAD⁺.

Aus diesen Beobachtungen und Überlegungen ließe sich folgende Hypothese ableiten (Abb. 4.1): Ein limitierender Faktor für die hohe NAD⁺ Sensitivität der Tregs ist die Expression von ART2. Ist sie hoch, wie bei C57BL/6 Tregs, so können große Mengen P2X7 schon bei niedrigen NAD⁺ Konzentrationen ADP-ribosyliert und somit aktiviert werden. Ist sie gering, wie bei Balb/c und DBA/1 Tregs, so sind trotz hoher P2X7 Expressionsdichte höhere NAD⁺ Konzentrationen für die Aktivierung nötig. Thelp exprimieren weniger P2X7 als Tregs und reagieren, auch bei höherer ART2 Expression, nur schwach auf NAD⁺. Balb/c Thelp zeigen, möglicherweise aufgrund ihrer sensitiveren P2X7 Rezeptor Variante (451P), eine stärkere Reaktion auf NAD⁺. Unterstützt wird diese Hypothese von Ergebnissen mit kongenen Balb/c Mäusen, die den ART2 Genlokus der C57BL/6 Maus exprimieren (Stamm: BAL-ART2B6). Für die Züchtung dieses Mausstammes wurden Balb/c ART2ko Mäuse mit C57BL/6 Mäusen verpaart und ART2⁺ Nachkommen über 10 Generationen auf Balb/c ART2ko Mäuse rückgekreuzt. Die CD4⁺ T Zellen dieser Mäuse zeigen eine ähnlich starke ART2 Expression wie die der C57BL/6 Mäuse. Dosis-Wirkungsexperimente zeigen, dass die Tregs dieser BAL-ART2B6 Mäuse eine ähnlich hohe NAD⁺ Sensitivität wie C57BL/6 Tregs. Dieses unterstützt die Hypothese, dass die hohe NAD⁺ Empfindlichkeit dieser Tregs auf die Kombination von hoher ART2 und hoher P2X7 Expression zurückzuführen ist.

Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren die hohe NAD⁺ Sensitivität der Tregs mit beeinflussen. Andere Studien beschreiben die Existenz und Funktion von Zell extrinsischen Faktoren, die die Aktivierbarkeit von P2X7 modulieren können. So wird die Aktivierungsschwelle von P2X7 auf T Zellen beispielsweise in Gegenwart von Lipopolysaccharid (LPS) erhöht (Leiva-Salcedo *et al.*, 2011) und in transfizierten HEK-Zellen durch die Bindung des anti-mikrobiellen Peptids LL-37 gesenkt (Tomasinsig *et al.*, 2008). Zudem könnten auch weitere Zell-inherente Faktoren die NAD⁺ Sensitivität von Tregs und Thelp beeinflussen. So wurden z.B: zwei unterschiedlich sensitive P2X7 *splice* Varianten beschrieben (Nicke *et al.*, 2009). Dabei wurde gezeigt, dass beide, die sensitive P2X7(k) und die weniger sensitive P2X7(a) Variante, in den lymphatischen Kompartimenten Thymus und Milz vorkommen. Welche dieser *splice* Varianten von Tregs und Thelp Zellen exprimiert werden, könnte ggf. anhand von RT-PCR Experimenten geklärt werden.

Es stellt sich die Frage, ob und in wiefern die hohe NAD⁺ Sensitivität die Funktion von Tregs *in vivo* moduliert. Ein Mechanismus, bei dem NAD⁺ *in vivo* T Zellen beeinflusst, wurde von Adriouch *et al.* 2007 in Balb/c CD38ko Mäusen und auch in etwas schwächerer Form in Balb/c WT Mäusen aufgezeigt: NAD, das im Rahmen einer lokalen, durch Injektion von Polyacrylamid-Kügelchen ausgelösten, Entzündungsreaktion freigesetzt wurde, gelangte bis in den drainierenden Lymphknoten und führte dort bei WT und CD38ko, nicht aber bei ART2ko Mäusen, zur apoptotischen Deletion von T Zellen (Adriouch *et al.*, 2007). In dieser Studie wurde nicht zwischen Tregs und Thelp unterschieden. Denkbar wäre, dass - insbesondere in C57BL/6 Mäusen - dabei vorwiegend die Zellpopulation der Tregs betroffen ist. Somit würde eine lokale Entzündung und die damit verbundene Freisetzung von NAD⁺

zur apoptotischen Deletion von Tregs im drainierenden Lymphknoten kommen. Dadurch würde die Etablierung einer T Zell-basierten Immunantwort gegen die Inflammation verursachenden Pathogene erleichtert (Abb. 4.2A). Im Zuge der T Zell Aktivierung wird ART2 proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten (Kahl *et al.*, 2000). Aktivierte Effektor T-Zellen sind somit unempfindlich gegenüber extrazellulärem NAD. Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen hingegen, wenn es gilt Immunreaktion gegen Eigenantigene zu verhindern, unterdrücken Tregs effektiv eine T Zell Immunantwort (Abb. 4.2B).

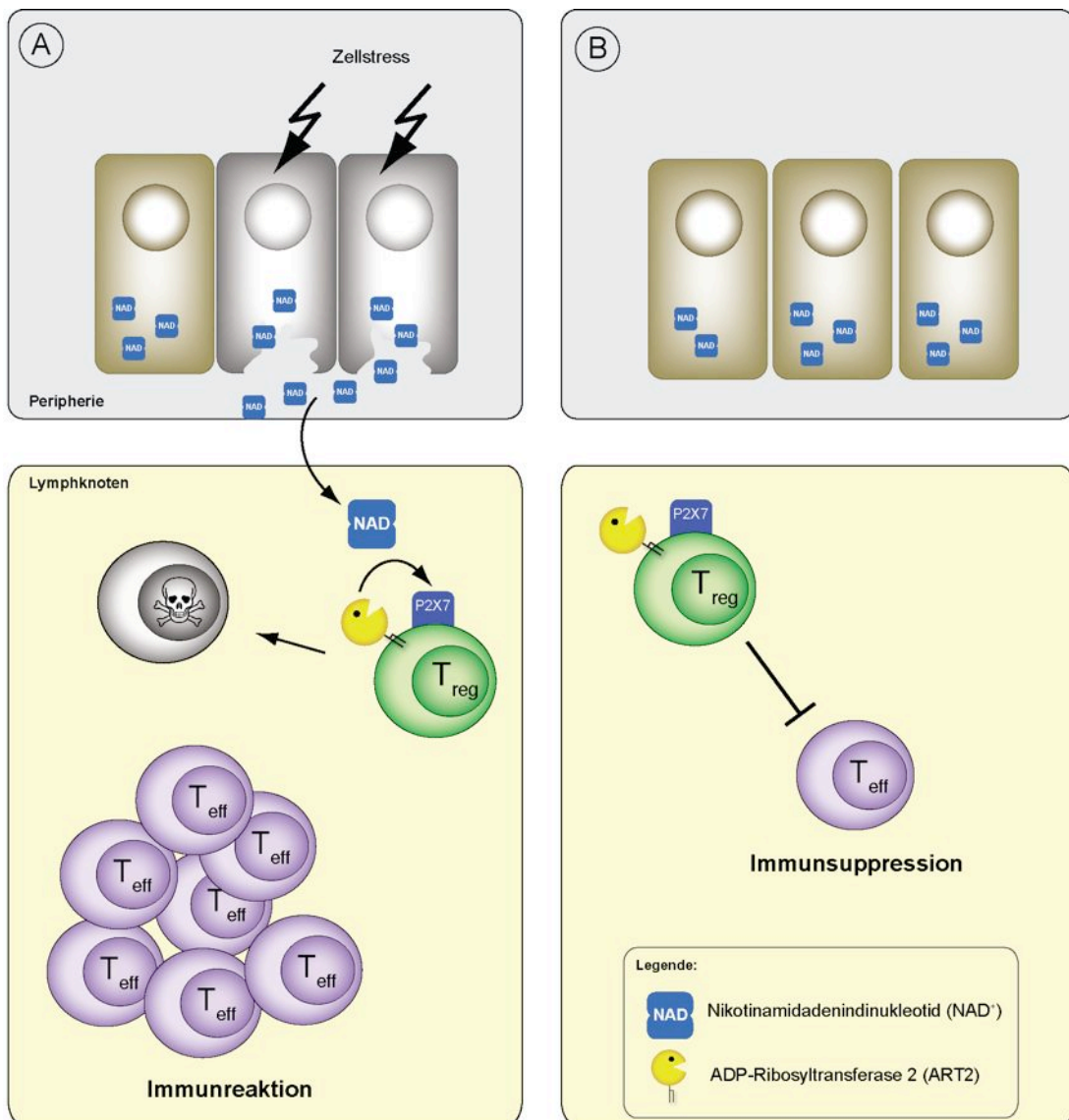


Abb. 4.2: NAD⁺ wirkt als DAMP auf Tregs und führt zur Etablierung eines proinflammatorischen Milieus.

(A) Durch Zellschäden freigesetztes NAD⁺ führt zur apoptotischen Inaktivierung von Tregs im drainierenden Lymphknoten. Dadurch wird die Etablierung einer T Zell Immunantwort begünstigt. (B) Unter naiven Bedingungen können Tregs unbehindert eine T Zell Immunantwort unterdrücken.

Weitere Hinweise darauf, dass die NAD-bedingte Reduzierung der Treg-Anzahl und die damit verbundene Verschiebung des Treg/Teff Gleichgewichts *in vivo* von Bedeutung sind, liefert das *non-obese diabetic* (NOD) Mausmodell. NOD WT Mäuse entwickeln ca. ab ihrer 10. Lebenswoche einen spontanen, autoimmunen Typ 1 Diabetes (Kikutani and Makino, 1992) und weisen - ähnlich wie C57BL/6 Mäuse - eine hohe ART2 Expression auf (Koch-Nolte *et al.*, 1999). Auffällig ist, dass NOD Mäuse, die genetisch defizient für CD38 sind, eine geringere Anzahl an Tregs im pankreatischen Lymphknoten aufweisen als NOD WT Mäuse und dass die Entwicklung und Etablierung der Diabetes Erkrankung bei NOD CD38ko Mäusen früher einsetzt als bei NOD WT Mäusen (Chen *et al.*, 2006a; Scheuplein *et al.*, 2010). Die Bedeutung der Tregs im NOD Mausmodell wurde ferner in adaptiven Transfer Experimenten bekräftigt. Hier führte der Transfer von Tregs zur Verzögerung der Manifestation der Erkrankung oder sogar zur Remission (Tang *et al.*, 2004).

Möglicherweise hat extrazelluläres NAD auch unter homöostatischen Bedingungen Einfluss auf naive Tregs. Unbehandelte C57BL/6 P2X7ko Mäuse weisen eine leicht erhöhte Anzahl an Tregs in Milz, Lymphknoten und Blut im Vergleich zu C57BL/6 WT Mäuse auf (Aswad *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2010), C57BL/6 CD38ko Mäuse hingegen eine leicht reduzierte Anzahl an Tregs in peripheren Lymphknoten (Hubert *et al.*, 2010)..

Aufgrund dieser Beobachtungen erfüllt NAD im extrazellulären Raum, ähnlich wie auch ATP, die Kriterien eines sogenannten *danger associated molecular pattern* (DAMP) (la Sala *et al.*, 2003). NAD ist in jeder eukaryotischen Zelle präsent und wäre ideal dafür geeignet, bei Freisetzung dem Immunsystem Zellschädigung zu signalisieren. Der in dieser Arbeit beobachtete Mechanismus, bei dem das freigesetzte NAD selektiv Tregs über die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 ausschaltet, könnte dazu beitragen dass das Immunsystem adäquat auf Zellschäden reagiert.

4.2 Bei der Präparation freigesetztes NAD⁺ hat Einfluss auf die Funktion der präparierten Tregs

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Analysen zeigten, dass ein großer Anteil Tregs bereits mit der Externalisation von PS und der Abspaltung von CD27 reagiert, wenn sie bei 37 °C in Abwesenheit von NAD⁺ inkubiert werden (Abb. 3.3-4). Erklären lässt sich dieses Phänomen durch bei der Zellpräparation freigesetztes NAD⁺. Als NAD⁺ Quellen kommen dabei u.a. lysierte Erythrozyten und mechanisch gestresste Zellen in Frage (Scheuplein *et al.*, 2009). So ist beschrieben, dass NAD⁺ über Connexin43 Hemikanäle von lebenden Zellen freigesetzt werden kann (Bruzzone *et al.*, 2001) und dass die Expression von Connexin43 durch auf Zellen wirkende Scherkräfte hochreguliert wird (Inai *et al.*, 2004). Ob Connexin43 eine Rolle bei der Freisetzung von NAD während der Zellpräparation aus Lymphknoten und Milz spielt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Langfristige Folgen der ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Zellpräparation sind die Induktion der Apoptose/Nekrose sowie eine deutliche Einschränkung der Suppressor Funktion. Sichtbar wird der Zelltod durch die Anfärbbarkeit mit dem DNA-bindenden Farbstoff Propidiumiodid (Abb. 3.10). Funktionell geht der Verlust an vitalen Tregs einher mit einer geringeren Suppressor Kapazität der WT Tregs im Vergleich zu Tregs mit nicht-funktionellem ART2 oder P2X7 (Abb. 3.11). Zudem können die hoch NAD-sensitiven Tregs aus CD38ko Mäusen die *in vitro* Proliferation von Responder T Zellen (Tresp) nicht bzw. nur schwach inhibieren (siehe Abb. 3.12).

Die präparationsbedingte ADP-Ribosylierung von P2X7 und anderen Membranproteinen wirft für die Nutzung von Tregs in weiterführenden Experimenten mehrere Probleme auf: Eine Folge der besonders geringen Suppressorkapazität von WT Tregs auf dem C57BL/6 Hintergrund könnte sein, dass eine genetisch bedingte weitere Verminderung der Suppressorkapazität kaum detektierbar wäre. So konnte z.B. für IL-10KO Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund bislang keine Beeinträchtigung im *in vitro* Suppressor Experiment nachgewiesen werden (Shevach, 2009), im Kontrast zur Bedeutung von IL-10 für die Funktion der Tregs *in vivo*. Ein weiteres mögliches Problem der präparationsbedingten ADP-Ribosylierung könnte in der damit verbundenen Selektion von Tregs eines bestimmten Treg Phänotyps liegen. So wären etwa die wenigen ART2⁻ Tregs aus Milz und Lymphknoten resistent gegenüber der NAD-abhängigen Aktivierung von P2X7. Es wurde ferner berichtet, dass CD38^{high} Tregs aus C57BL/6 WT Mäusen, die viel CD38 exprimieren, deutlich bessere *in vitro* Suppressoren sind als CD38^{low} Tregs, die wenig CD38 exprimieren (Patton *et al.*, 2011). Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, aus denen sich folgende Erklärung ableiten ließe: während der Präparation würden vornehmlich die CD38^{low} Tregs ADP-ribosyliert, da CD38^{high} Tregs das ART2-Substrat effektiver hydrolysieren könnten.

Es wird somit deutlich, dass es von Vorteil wäre, die ADP-Ribosylierung während der Zellpräparation zu unterbinden, zum einen um die Sensitivität von *in vitro* T Zell Suppressionsexperimenten zu erhöhen und zum anderen um falschen Interpretationen von Ergebnissen vorzubeugen. Eine Möglichkeit, die ADP-Ribosylierung im Rahmen der Zellpräparation zu verhindern, besteht darin, den ART2-blockierenden Nanobody s+16a vor der Präparation in die Maus zu spritzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dadurch die Zellvitalität und die Suppressoraktivität von WT und CD38ko Tregs *in vitro* deutlich verbessert werden kann (Abb. 3.9/3.10, Abb. 3.12).

Die Blockade der ADP-Ribosylierung während der Präparation von Tregs wäre auch für *in vivo* Treg Transfer Experimente nützlich. Bei einer Vielzahl von Mausmodellen für autoimmune oder andere immunpathologische Erkrankungen wird als therapeutischer Ansatz der adoptive Transfer von Tregs durchgeführt, um überschießende Immunreaktionen zu dämpfen. Einige Modelle, bei denen Tregs für therapeutische Zwecke eingesetzt werden, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Dabei fällt auf, dass bei Colitis und *graft versus host disease* Modellen, oftmals eine höhere Anzahl an Tregs aus C57BL/6 Donormäusen benötigt werden

als aus Balb/c oder DBA/1 Donormäusen (Mottet and Uhlig, 2003; Kullberg *et al.*, 2002; Murai *et al.*, 2009; Read *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten höheren NAD⁺ Sensitivität von C57BL/6 Tregs gegenüber BALB/c und DBA/1 Tregs (Abb. 3.7) Überprüfen liesse sich diese Hypothese etwa durch einen vergleichenden Transfers von WT Tregs und ART2ko Tregs bzw. von Tregs, die aus WT Mäusen nach Injektion des ART2-blockierenden Nanobodies s+16a vor der Zellpräparation gewonnen wurden.

Tabelle 4.1 Adoptiver Transfer von Tregs als Therapie verschiedener muriner Krankheitsmodelle

Mausmodell	Donor Mausstamm	Transferierte Zellen	Referenz
Chronische Colitis	C57BL/6	1 x 10 ⁶ 4 x 10 ⁵ 1 x 10 ⁵	Mottet and Uhlig, 2003 Kullberg et al., 2002 Murai et al., 2009
	Balb/c	1 x 10 ⁵ 1 x 10 ⁵	Read et al., 2000 Liu et al., 2003
	129Sv	1 x 10 ⁵	Maloy et al., 2003
<i>graft-vs-host disease</i>	C57BL/6	5 x 10 ⁶ 2 x 10 ⁶ 5 x 10 ⁵ 5 x 10 ⁵	Cohen et al., 2002 Taylor et al., 2002 Edinger et al., 2003 Ermann et al., 2005
	Balb/c	1 x 10 ⁶	Anderson et al., 2004
Kollagen induzierte Arthritis	DBA/1	5 x 10 ⁵	Morgan et al., 2003
Schlaganfall	C57BL/6	8 x 10 ⁶	Liesz et al., 2009
Autoimmune Hepatitis	C57BL/6	1 x 10 ⁶	Erhardt et al., 2007
Experimentelle Autoimmune Enzephalitis	C57BL/6	3 x 10 ⁶ 2 x 10 ⁶	Rojo et al., 2008 Kohm et al., 2002
Autoimmune Diabetes	NOD	8 x 10 ⁶ 5 x 10 ⁶	Salomon et al., 2000 Tang et al., 2004

4.3 Die Injektion von NAD⁺ ist eine effiziente Methoden zur Ausschaltung von Tregs *in vivo*

Die hohe NAD⁺ Sensitivität der Tregs von C57BL/6 Mäusen bietet die Möglichkeit der pharmakologischen Manipulation *in vivo* durch die Injektion von NAD⁺. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Injektion von NAD⁺ in C57BL/6 WT Mäuse zu einer selektiven Abnahme der Tregs *in vivo* führt (Abb. 3.13). Durch diese relative Abnahme der Tregs gegenüber anderen Effektor T Zellen (Teff) verschiebt sich das Treg/Teff Gleichgewicht zugunsten der Teff, was das Auslösen einer Immunantwort erleichtert. Deutlich wird dies im B16 Tumor Mausmodell. C57BL/6 Mäuse zeigen eine relative Abnahme der Tregs nach NAD⁺ Behandlung und ein langsames Tumorstadium im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 3.15). Ähnliche Ergebnisse lieferte die

parallel durchgeführte *in vivo* Depletion der Tregs durch den anti-CD25 Antikörper PC61. Neben diesen beiden Strategien zur funktionellen Ausschaltung von Tregs *in vivo* besteht die Möglichkeit der Toxin-vermittelten Depletion von Tregs bei transgenen DEREK Mäusen (siehe Abb. 3.1). Diese Mäuse exprimieren ein GFP-Diphtherietoxinrezeptor (GFP-DTR) Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors. Dies führt dazu, dass Foxp3 exprimierende Tregs in diesen Mäusen GFP⁺ sind und durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) *in vivo* depletiert werden können (Lahl *et al.*, 2007). Auch in diesem Modell konnte ein hemmender Effekt der Treg Depletion auf das Wachstum von B16 Tumoren gezeigt werden (Klages *et al.*, 2010).

Bei der Abwägung der Vor- und Nachteile dieser drei Ansätze zur Manipulation von Tregs *in vivo* sind Wirkmechanismen, Spezifität, Effizienz, Nebenwirkungen, Flexibilität des Systems und potentielle therapeutische Übertragung auf den Menschen zu berücksichtigen.

Wirkmechanismus

Die NAD vermittelte *in vivo* Treg Manipulation führt über die Aktivierung der ART2/P2X7 Achse zum apoptotischen Zelltod der Tregs. Ähnlich führt auch die Injektion von Diphtherietoxin in DEREK Mäuse zur Vermittlung des Zelltods von Tregs, da die Foxp3-exprimierende Tregs den für die Vermittlung der DT Toxizität nötigen DTR exprimieren. Die Treg *in vivo* Depletion via PC61 hingegen erfolgt durch die Bindung von PC61 an CD25 auf der Zelloberfläche von Tregs und die anschließende FcγRIII⁺ vermittelte Phagozytose durch Makrophagen (Setiady *et al.*, 2010). Es ist anzunehmen, dass apoptotische T Zellen, sei es durch NAD⁺ oder DT in DEREK Mäusen vermittelt, ebenfalls von Phagozyten beseitigt werden. Dafür sprechen unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass CD4⁺ T Zellen, die nach P2X7 Aktivierung PS auf der Zelloberfläche externalisieren, effektiv durch peritoneale Makrophagen phagozytiert werden.

Spezifität, Nebenwirkungen und Effizienz

Die Injektion von NAD⁺ beeinflusst primär Tregs, die eine hohe ART2 und P2X7 Expression aufweisen, während andere T Zellen weniger empfindlich auf NAD⁺ reagieren. Da NAD⁺ schnell *in vivo* abgebaut wird, müssen für eine effektive Treg Depletion relativ hohe NAD⁺ Dosen verabreicht werden (60mg/Maus) (Abb. 3.13). Es ist denkbar, dass auch andere hämatopoietischen und nicht-hämatopoietische Zellen durch die NAD⁺ Injektion beeinflusst werden können. So wurde beispielsweise beschrieben, dass CD4⁺NK1.1⁺ NKT Zellen ebenfalls nach Injektion von NAD⁺ depletiert werden (Kawamura *et al.*, 2006). Eine weitere in den hier beschriebenen Experimenten beobachtete Nebenwirkung war eine vorübergehende Bradykardie nach NAD⁺ Injektion. Ob NAD⁺ selbst oder NAD⁺ Abbauprodukte dafür verantwortlich sind muss in weiteren Experimente geklärt werden. Jedoch ist bekannt, dass ADP-Ribose, Nikotinamid, Harnsäure, Inosin und AMP in der Leber als Abbauprodukte von NAD⁺ generiert werden können (Broetto-Biazon *et al.*, 2008b; Broetto-Biazon *et al.*, 2008a). Die hier durchgeführte NAD⁺ Behandlung bewirkte eine effektivere ca. 80%ige Abnahme

der Tregs, als die durch PC61 Injektion vermittelte (ca. 60%) (Abb. 3.14A). Zudem ist eine PC61 vermittelte spezifische Depletion von Tregs nur in naiven Mäusen möglich, da nach Aktivierung auch Effektor T Zellen, NK und B Zellen CD25 exprimieren. Tenorio *et al.* 2011 konnten beispielsweise zeigen, dass die Injektion von PC61 während einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* nur ca 40% der Tregs, aber 70% der aktivierten NK Zellen eliminiert (Tenorio *et al.*, 2011). Spezifität und Effizienz der Treg-Depletion sind vermutlich im DEREK Modell am höchsten. Da die Expression von Foxp3 in der Maus auf Tregs beschränkt ist, werden nach mehrfacher DT Injektion gezielt diese Zellen eliminiert. Die Depletionsrate der Tregs beträgt dabei bis zu 90% (Lahl *et al.*, 2007). Allerdings zeigen auch DT Injektionen Nebenwirkungen, u.a. auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen, obwohl Mäuse im Gegensatz zu Menschen keinen natürlichen DTR exprimieren. Hohe Dosen an DT führen zudem in der Maus zu einem Leberstau und Herzversagen (Lahl and Sparwasser, 2011).

Flexibilität und Übertragung auf den Menschen

PC61 stellt einen konsistenten Ansatz zur *in vivo* Depletion von Tregs dar, da CD25 in verschiedenen Mausstämmen auf Tregs exprimiert wird. Allerdings sind Mäuse, die einen Phagozytosedefekt aufweisen, resistent gegenüber diesem Ansatz (Setiady *et al.*, 2010). Die NAD-vermittelte Treg *in vivo* Depletion ist besonders effizient bei C57BL/6 WT und CD38ko Mäusen. In Balb/c Mäusen hingegen führen NAD-Injektionen auch zur Abnahme anderer T Zellen (Adriouch *et al.*, 2007). Die Etablierung des DEREK Systems in anderen Mausstämmen erfordert die Übertragung des DEREK Transgen und mehrere Generationen von Rückkreuzungen. Danach kann das DEREK Transgen über einfache Kreuzungen in KO-Mäuse des gleichen Stammes transferiert werden.

Alle drei Ansätze sind nur bedingt auf den Menschen übertragbar. Erste Ergebnisse einer klinischen Studie, bei der anti-CD25 Antikörper Daclizumab in Kombination mit einem anti-Tumor Vakzine eingesetzt wurde, zeigte jedoch eine Abnahme an CD4+CD25+Foxp3+ Tregs bei Patienten mit metastasiertem Brustkrebs (Rech and Vonderheide, 2009). Das DEREK System und die NAD-vermittelte Treg Depletion sind nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Für eine Toxin vermittelte Depletion von Tregs beim Menschen müsste das Toxin zielgerichtet auf Tregs gelenkt werden, z.B. über die Konjugation an einen Antikörper oder an einen Liganden für einen Rezeptor, der auf Tregs spezifisch hoch exprimiert wird. Die Aktivierung von P2X7 über die NAD-abhängige ADP-Ribosylierung ist beim Menschen nicht möglich, da das ART2 kodierende Gen des Menschen durch interne Stop-Codons inaktiviert ist (Haag, 1994). Die Zukunft wird zeigen, ob für den Menschen ein alternatives pharmazeutisches Werkzeug zur gezielten Aktivierung von P2X7 auf Tregs entwickelt werden kann.

Fazit

Die NAD⁺ vermittelte Depletion von Treg in C57BL/6 Mäusen bildet eine interessante Alternative zur DT vermittelten Depletion von Tregs in DEREK Mäusen oder zur Injektion des anti-CD25 Antikörpers PC61. Alle drei Ansätze zur *in vivo* Treg Depletion zeigen ähnliche funktionelle Auswirkungen im Maus Tumormodell. Ein Vorteil der NAD⁺ Variante ist die rasche Verteilung und der schnelle Abbau *in vivo*. NAD⁺ intravenös injiziert verteilt sich schnell in der Maus führt zur ADP-Ribosylierung von P2X7 auf den Tregs in Milz und Lymphknoten und somit zur schnellen Inaktivierung dieser Zellen. Die hohen NAD⁺ Dosen sind jedoch mit erheblichen kurzfristigen Nebenwirkungen verbunden, die möglicherweise eben durch diese Abbauprodukte bewirkt werden. Aus diesem Grund wäre es möglicherweise sinnvoll, den *in vivo* Abbau von NAD⁺ zu kontrollieren, z.B. durch gleichzeitige Verabreichung eines CD38 Inhibitors. Zudem gilt es zu testen, ob ein therapeutischer Effekt ggf. auch durch eine lokale Depletion von Tregs z.B. in die Haut drainierenden Lymphknoten durch eine subkutane Injektion mit niedrigeren NAD Dosen möglich ist.

4.4 Ausblick

Die Sensitivität von T Zellen und besonders von Tregs gegenüber extrazellulärem NAD⁺ birgt sowohl Chancen als auch Probleme. So bietet sich dadurch eine alternative Möglichkeit der gezielten *in vivo* Manipulation von Tregs. Es ist jedoch nötig, weitere Auswirkungen und Nebenwirkungen von pharmakologischen NAD⁺ Injektionen *in vivo* zu untersuchen und die NAD⁺ Abbauprodukte sowie deren Funktionen *in vivo* näher zu analysieren. Zudem wäre es interessant zu testen, ob Tregs lokal in drainierenden Lymphknoten durch subkutane NAD Injektionen erreicht werden können und zu untersuchen, welche Auswirkung eine lokale, auf Tumor drainierende Lymphknoten beschränkte Treg Depletion auf den Verlauf der Tumorerkrankung hätte. Zudem gilt es das Problem der präparationsbedingten Beeinflussung von Tregs durch freigesetztes NAD zu erkennen und zu konfrontieren. ART2-blockierende Nanobodies wie s+16a stellen hierfür ein ideales Werkzeug dar. In weiteren Versuchen könnten nach Behandlung mit s+16a Unterschiede in den Suppressoreigenschaften von Tregs aus WT und verschiedenen *knock-out* Mäusen (IL-10ko, TGFβko, CTLA4ko) ohne den störenden Einfluss der präparationsbedingten ADP-Ribosylierung von P2X7 besser beurteilt werden. Zudem könnte die s+16a vermittelte Blockade von ART2 während der Präparation funktionstüchtigere Tregs für adoptiven Treg Transferexperimente bereitstellen. Schließlich könnten die molekulare Grundlage für die Unterschiede in der NAD Sensitivität von Tregs und Thelp, etwa die Expression unterschiedlicher P2X7 Splice-Varianten näher eruiert werden.

5. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklische Adenosinmonophosphat
cADPR	zyklische ADP-Ribose
CDR	<i>complementary determining region</i>
CTL	zytotoxischer Lymphozyt
DAMPs	<i>damage associated molecular pattern</i>
DC	dendritische Zelle
DEREG	<i>Depletion of regulatory T cells</i>
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HMGB1	<i>high mobility group protein B1</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
IFN γ	Interferon gamma
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
Teff	Effektor T Zellen
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
Thelp	T Helferzellen
Tregs	regulatorische T Zellen
Tresp	<i>responder</i> T Zellen
TZR	T Zell Rezeptor
VHH	<i>variable domain of the heavy chain of heavy-chain-antibodies</i>

6. Literatur

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.
- Adinolfi, E., Pizzirani, C., Idzko, M., Panther, E., Norgauer, J., Virgilio, F., and Ferrari, D. (2005). P2X7 receptor: Death or life? *Purinergic Signalling* 1, 219–227.
- Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F., and Haag, F. (2002). Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *Journal of Immunology* 169, 4108–4112.
- Adriouch, S., Hubert, S., Pechberty, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., and Seman, M. (2007). NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *Journal of Immunology* 179, 186–194.
- Anderson, B.E., McNiff, J.M., Matte, C., Athanasiadis, I., Shlomchik, W.D., and Shlomchik, M.J. (2004). Recipient CD4⁺ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104, 1565–1573.
- Arora, S.K. (2002). Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. *Methods Cell Science* 24, 37–40.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184, 387–396.
- Aswad, F., Kawamura, H., and Dennert, G. (2005). High sensitivity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *Journal of Immunology* 175, 3075–3083.
- Bannas, P., Adriouch, S., Kahl, S., Braasch, F., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2005). Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood* 105, 3663–3670.
- Banuelos, S.J., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Lyons, B.L., Rossini, A.A., and Appel, M.C. (2004). Rejection of human islets and human HLA-A2.1 transgenic mouse islets by alloreactive human lymphocytes in immunodeficient NOD-scid and NOD-Rag1nullPrf1null mice. *Clinical Immunology* 112, 273–283.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2009). *Stryer Biochemie (German Edition)* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., *et al.* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1303– 1310.
- Bots, M., and Medema, J.P. (2006). Granzymes at a glance. *J. Cell. Sci.* *119*, 5011–5014.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* *112*, 358–404.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* *272*, 26159–26165.
- Broetto-Biazon, A.C., Bracht, F., Bracht, L., Kelmer-Bracht, A.M., and Bracht, A. (2008a). Transformation and action of extracellular NAD⁺ in perfused rat and mouse livers. *Acta Pharmacol. Sin.* *30*, 90–97.
- Broetto-Biazon, A.C., Bracht, F., de Sá-Nakanishi, A.B., Lopez, C.H., Constantin, J., Kelmer-Bracht, A.M., and Bracht, A. (2008b). Transformation products of extracellular NAD(+) in the rat liver: kinetics of formation and metabolic action. *Mol. Cell. Biochem.* *307*, 41–50.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68–73.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora, A. (2001). Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J.* *15*, 10–12.
- Burnstock, G. (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* *36*, 1127–1139.
- Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 166–176.

- Chen, J., Chen, Y.-G., Reifsnnyder, P.C., Schott, W.H., Lee, C.-H., Osborne, M., Scheuplein, F., Haag, F., Koch-Nolte, F., Serreze, D.V., *et al.* (2006a). Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion. *Journal of Immunology* *176*, 4590–4599.
- Chen, L., and Brosnan, C.F. (2006). Regulation of immune response by P2X7 receptor. *Crit. Rev. Immunol.* *26*, 499–513.
- Chen, M.-L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., Boehmer, von, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *102*, 419–424.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2006b). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* *314*, 1792–1795.
- Cheng, G., Yu, A., and Malek, T.R. (2011). T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunol Rev* *241*, 63–76.
- Chessell, I.P., Michel, A.D., and Humphrey, P.P. (1998). Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. *British Journal of Pharmacology* *124*, 1314–1320.
- Cockayne, D.A., Muchamuel, T., Grimaldi, J.C., Muller-Steffner, H., Randall, T.D., Lund, F.E., Murray, R., Schuber, F., and Howard, M.C. (1998). Mice deficient for the ecto- nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* *92*, 1324–1333.
- Cohen, J.L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D., and Salomon, B.L. (2002). CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease. *Journal of Experimental Medicine* *196*, 401–406.
- Collison, L.W., and Vignali, D.A.A. (2011). *Methods in Molecular Biology* (Totowa, NJ: Humana Press).
- Courageot, M.-P., Lépine, S., Hours, M., Giraud, F., and Sulpice, J.-C. (2004). Involvement of sodium in early phosphatidylserine exposure and phospholipid scrambling induced by P2X7 purinoceptor activation in thymocytes. *J. Biol. Chem.* *279*, 21815–21823.
- Darai, G., Handermann, M., and Hinz, E. (1997). *Lexikon Der Infektionskrankheiten Des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie Und Prophylaxe* (German Edition) (Springer).

- De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S., and Wyns, L. (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 4586–4591.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- Desmyter, A., Transue, T.R., Ghahroudi, M.A., Thi, M.H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S., and Wyns, L. (1996). Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 803–811.
- Di Virgilio, F. (2005). Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling* *1*, 205–209.
- Di Virgilio, F., Boeynaems, J.-M., and Robson, S.C. (2009). Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Current Opinion in Pharmacology* *9*, 507–513.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., and Baricordi, O.R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* *97*, 587–600.
- Dinarello, C.A. (2007). Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin. Nephrol.* *27*, 98–114.
- Dombrowski, K.E., Ke, Y., Brewer, K.A., and Kapp, J.A. (1998). Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev* *161*, 111–118.
- Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C.G., Strober, S., and Negrin, R.S. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* *9*, 1144–1150.
- Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T., and Tiegs, G. (2007). IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* *45*, 475–485.
- Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* *105*, 2220– 2226.
- Ezekowitz, R., and Hoffmann, J. (1996). Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 1–2.

- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *Journal of Immunology* *176*, 3877–3883.
- Ferrero, E., and Malavasi, F. (1999). The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38. *J. Leukoc. Biol.* *65*, 151–161.
- Filippini, A., Taffs, R.E., and Sitkovsky, M.V. (1990). Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *87*, 8267– 8271.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor *foxp3*. *Immunity* *22*, 329–341.
- Germann, T., Szeliga, J., Hess, H., Störkel, S., Podlaski, F.J., Gately, M.K., Schmitt, E., and Rude, E. (1995). Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *92*, 4823–4827.
- Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., and Borea, P.A. (2011). Adenosine receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol.* *61*, 41–75.
- Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., *et al.* (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* *202*, 1075–1085.
- Gibbs, W.W. (2005). Nanobodies. *Sci. Am.* *293*, 78–83.
- Givan, A.L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol. Biol.* *699*, 1–29.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology* *174*, 1783–1786.
- Goral, S. (2011). The three-signal hypothesis of lymphocyte activation/targets for immunosuppression. *Dial. Transplant.* *40*, 14–16.
- Gu, B., Bendall, L.J., and Wiley, J.S. (1998). Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* *92*, 946–951.

- Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). ANTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621–667.
- Haag, F. (1994). Premature Stop Codons Inactivate the RT6 Genes of the Human and Chimpanzee Species. *Journal of Molecular Biology* 243, 537–546.
- Haag, F., Adriouch, S., Braß, A., Jung, C., Möller, S., Scheuplein, F., Bannas, P., Seman, M., and Koch-Nolte, F. (2007). Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling* 3, 71–81.
- Hahn, B.H. (1998). Antibodies to DNA. *N. Engl. J. Med.* 338, 1359–1368.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Micro* 4, 423–434.
- Harden, T.K., Sesma, J.I., Fricks, I.P., and Lazarowski, E.R. (2010). Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol (Oxf)* 199, 149–160.
- Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., and Herzenberg, L.A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem.* 48, 1819–1827.
- Hollmann, C., Haag, F., Schlott, M., Damaske, A., Bertuleit, H., Matthes, M., Kühl, M., Thiele, H.G., and Koch-Nolte, F. (1996). Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. *Mol. Immunol.* 33, 807–817.
- Hong, S., Braß, A., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Dubyak, G.R. (2007). Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. *Journal of Immunology* 179, 6215–6227.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Löffler, B., Schaller, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* 1–12.

- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., and Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J. Exp. Med.* *207*, 2561–2568.
- Ibrahim, S.F., and van den Engh, G. (2007). Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *106*, 19–39.
- Inai, T., Mancuso, M.R., McDonald, D.M., Kobayashi, J., Nakamura, K., and Shibata, Y. (2004). Shear stress-induced upregulation of connexin 43 expression in endothelial cells on upstream surfaces of rat cardiac valves. *Histochem. Cell Biol.* *122*, 477–483.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (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. *Journal of Immunology* *162*, 5317–5326.
- Iyer, S.S., Pulskens, W.P., Sadler, J.J., Butter, L.M., Teske, G.J., Ulland, T.K., Eisenbarth, S.C., Florquin, S., Flavell, R.A., Leemans, J.C., *et al.* (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 20388–20393.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* *165*, 302–319.
- Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E.H., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2000). Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *Journal of Immunology* *165*, 4463– 4469.
- Kawamura, H., Aswad, F., Minagawa, M., Govindarajan, S., and Dennert, G. (2006). P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. *Journal of Immunology* *176*, 2152–2160.
- Kawamura, H., Aswad, F., Minagawa, M., Malone, K., Kaslow, H., Koch-Nolte, F., Schott, W.H., Leiter, E.H., and Dennert, G. (2005). P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of Immunology* *174*, 1971–1979.
- Kikutani, H., and Makino, S. (1992). The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* *51*, 285–322.

- Klages, K., Mayer, C.T., Lahl, K., Loddenkemper, C., Teng, M.W.L., Ngiow, S.F., Smyth, M.J., Hamann, A., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2010). Selective Depletion of Foxp3⁺ Regulatory T Cells Improves Effective Therapeutic Vaccination against Established Melanoma. *Cancer Research* *70*, 7788–7799.
- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Killeen, N., Ablamunits, V., Haag, F., and Leiter, E.H. (1999). A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *Journal of Immunology* *163*, 6014– 6022.
- Koch-Nolte, F., Hollmann, C., Kühl, M., Haag, F., Prochazka, M., Leiter, E., and Thiele, H.G. (1995). Molecular polymorphism in the Rt6 genes of laboratory mice correlates with the allotypes of the H1 minor histocompatibility system. *Immunogenetics* *41*, 152–155.
- Koch-Nolte, F., Kernstock, S., Mueller-Dieckmann, C., Weiss, M.S., and Haag, F. (2008). Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* *13*, 6716.
- Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., and Thiele, H.G. (1996). Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribose)ltransferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J. Biol. Chem.* *271*, 7686–7693.
- Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schössow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., Haag, F., Alzogaray, V., Cauerhff, A., and Goldbaum, F.A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *Faseb J.* *21*, 3490–3498.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* *169*, 4712–4716.
- Krebs, C., Adriouch, S., Braasch, F., Koestner, W., Leiter, E.H., Seman, M., Lund, F.E., Oppenheimer, N., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2005). CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. *Journal of Immunology* *174*, 3298–3305.

- Kuhn, H.M., Brade, L., Appelmelk, B.J., Kusumoto, S., Rietschel, E.T., and Brade, H. (1992). Characterization of the epitope specificity of murine monoclonal antibodies directed against lipid A. *Infect. Immun.* *60*, 2201–2210.
- Kullberg, M.C., Jankovic, D., Gorelick, P.L., Caspar, P., Letterio, J.J., Cheever, A.W., and Sher, A. (2002). Bacteria-triggered CD4⁺ T Regulatory Cells Suppress Helicobacter hepaticus-induced Colitis. *Journal of Experimental Medicine* *196*, 505–515.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 571–606.
- la Rosa, de, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2480–2488.
- la Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., and Girolomoni, G. (2003). Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 339–343.
- Lahl, K., and Sparwasser, T. (2011). In vivo depletion of FoxP3⁺ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol. Biol.* *707*, 157–172.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* *204*, 57–63.
- Le Bras, S., and Geha, R.S. (2006). IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J. Clin. Invest.* *116*, 1473–1475.
- Lecut, C., Frederix, K., Johnson, D.M., Deroanne, C., Thiry, M., Faccinnetto, C., Marée, R., Evans, R.J., Volders, P.G.A., Bours, V., *et al.* (2009). P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J. Immunol.* *183*, 2801–2809.
- Leiva-Salcedo, E., Coddou, C., Rodríguez, F.E., Penna, A., Lopez, X., Neira, T., Fernández, R., Imarai, M., Rios, M., Escobar, J., *et al.* (2011). Lipopolysaccharide Inhibits the Channel Activity of the P2X7 Receptor. *Mediators of Inflammation* *2011*, 1–12.
- Li, L., and Boussiotis, V.A. (2006). Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. *J. Mol. Med.* *84*, 887–899.
- Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A., and Walcheck, B. (2006). ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood* *108*, 2275–2279.
- Li, Z., Liang, D., and Chen, L. (2008). Potential Therapeutic Targets for ATP-Gated P2X Receptor Ion Channels. *ASSAY and Drug Development Technologies* *6*, 277–284.

- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., and Veltkamp, R. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* *15*, 192–199.
- Lin, H. (2007). Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. *Organic & Biomolecular Chemistry* *5*, 2541–2554.
- Liu, H., Hu, B., Xu, D., and Liew, F.Y. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *Journal of Immunology* *171*, 5012– 5017.
- Liu, Z.X., Azhipa, O., Okamoto, S., Govindarajan, S., and Dennert, G. (2001). Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces t cell apoptosis in vivo and in vitro. *Journal of Immunology* *167*, 4942–4947.
- Loesberg, C., van Rooij, H., and Smets, L.A. (1990). Meta-iodobenzylguanidine (MIBG), a novel high-affinity substrate for cholera toxin that interferes with cellular mono (ADP-ribosylation). *Biochim. Biophys. Acta* *1037*, 92–99.
- Lovelace, P., and Maecker, H.T. (2011). Multiparameter intracellular cytokine staining. *Methods Mol. Biol.* *699*, 165–178.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* *17*, 167–178.
- Maloy, K., Salaun, L., and Cahill, R. (2003). CD4+CD25+ TR Cells Suppress Innate Immune Pathology Through Cytokine-dependent Mechanisms. *The Journal of ...*
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome. *Molecular Cell* *10*, 417–426.
- Moon, H., Na, H.-Y., Chong, K.H., and Kim, T.J. (2006). P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol. Lett.* *102*, 98–105.
- Morgan, M.E., Suttmuller, R.P.M., Witteveen, H.J., van Duivenvoorde, L.M., Zanelli, E., Melief, C.J.M., Snijders, A., Offringa, R., de Vries, R.R.P., and Toes, R.E.M. (2003). CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 1452–1460.
- Mottet, C., and Uhlig, H. (2003). Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*.

- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* *10*, 1178–1184.
- Müller, T., Robaye, B., Vieira, R.P., Ferrari, D., Grimm, M., Jakob, T., Martin, S.F., Di Virgilio, F., Boeynaems, J.-M., Virchow, J.C., *et al.* (2010). The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* *65*, 1545–1553.
- Naganuma, M., Wiznerowicz, E.B., Lappas, C.M., Linden, J., Worthington, M.T., and Ernst, P.B. (2006). Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *Journal of Immunology* *177*, 2765–2769.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.*
- Nemoto, E., Yu, Y., and Dennert, G. (1996). Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *Journal of Immunology* *157*, 3341–3349.
- Nicke, A., Kuan, Y.-H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., Górecki, D.C., Murrell-Lagnado, R.D., and Soto, F. (2009). A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 25813–25822.
- Nolan, K.F., Strong, V., Soler, D., Fairchild, P.J., Cobbold, S.P., Croxton, R., Gonzalo, J.-A., Rubio, A., Wells, M., and Waldmann, H. (2004). IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *Journal of Immunology* *172*, 2201–2209.
- Ohlrogge, W., Haag, F., Löhler, J., Seman, M., Littman, D.R., Killeen, N., and Koch-Nolte, F. (2002). Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7535–7542.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Research* *59*, 3128–3133.
- Palmer, R.K., Boyer, J.L., Schachter, J.B., Nicholas, R.A., and Harden, T.K. (1998). Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* *54*, 1118–1123.

- Patton, D.T., Wilson, M.D., Rowan, W.C., Soond, D.R., and Okkenhaug, K. (2011). The PI3K p110 δ regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS ONE* 6, e17359.
- Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25+Cd4+ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 192, 295–302.
- Rech, A.J., and Vonderheide, R.H. (2009). Clinical Use of Anti-CD25 Antibody Daclizumab to Enhance Immune Responses to Tumor Antigen Vaccination by Targeting Regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1174, 99–106.
- Resta, R., Yamashita, Y., and Thompson, L.F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161, 95–109.
- Rojo, J.M., Pini, E., Ojeda, G., Bello, R., Dong, C., Flavell, R.A., Dianzani, U., and Portolés, P. (2008). CD4+ICOS+ T lymphocytes inhibit T cell activation 'in vitro' and attenuate autoimmune encephalitis 'in vivo'. *Int. Immunol.* 20, 577–589.
- Saerens, D., Ghassabeh, G.H., and Muyltermans, S. (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 600–608.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531–562.
- Salmi, M., and Jalkanen, S. (2005). Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Publishing Group* 5, 760–771.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431–440.
- Salter, M.W., and Henry, J.L. (1985). Effects of adenosine 5'-monophosphate and adenosine 5'-triphosphate on functionally identified units in the cat spinal dorsal horn. Evidence for a differential effect of adenosine 5'-triphosphate on nociceptive vs non-nociceptive units. *Neuroscience* 15, 815–825.

- Säfholm, J., Lövdahl, C., Swedin, L., Boels, P.J.M., Dahlén, S.-E., Arner, A., and Adner, M. (2011). Inflammation-induced airway smooth muscle responsiveness is strain dependent in mice. *Pulm Pharmacol Ther* 24, 361–366.
- Scheuplein, F., Adriouch, S., Glowacki, G., Haag, F., Seman, M., and Koch-Nolte, F. (2003). Triggering of T-Cell Apoptosis by Toxin-Related Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010, 296–299.
- Scheuplein, F., Rissiek, B., Driver, J.P., Chen, Y.-G., Koch-Nolte, F., and Serreze, D.V. (2010). A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* 34, 145–154.
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2009). NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells. *J. Immunol.* 182, 2898–2908.
- Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J.-C., Röthlisberger, P., and Bachmann, M.F. (2003). Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 1465–1470.
- Schwarz, N., Fliegert, R., Adriouch, S., Seman, M., Guse, A.H., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2009). Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. *Purinergic Signalling* 5, 139–149.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., *et al.* (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693–1700.
- Seman, M., Adriouch, S., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2004). Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr. Med. Chem.* 11, 857–872.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19, 571–582.
- Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M., and Tokura, Y. (2001). Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* 103, 449–457.

- Setiady, Y.Y., Coccia, J.A., and Park, P.U. (2010). In vivodepletion of CD4 +FOXP3 +Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII +phagocytes. *Eur. J. Immunol.* *40*, 780–786.
- Shalev, I., Schmelzle, M., Robson, S.C., and Levy, G. (2011). Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Seminars in Immunology* 1–11.
- Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* *30*, 636–645.
- Siddiqui, S.A., Frigola, X., Bonne-Annee, S., Mercader, M., Kuntz, S.M., Krambeck, A.E., Sengupta, S., Dong, H., Cheville, J.C., Lohse, C.M., *et al.* (2007). Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2075–2081.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., and Gabel, C.A. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* *276*, 125–132.
- Srikiatkachorn, A., Chang, W., and Braciale, T.J. (1999). Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein is epitope and major histocompatibility complex independent. *J. Virol.* *73*, 6590–6597.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 139–176.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 685–711.
- Stephen J Turner, N.L.L.G.K.K.P.G.T.P.C.D. (2009). Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 286.
- Stout, J.G., Bassé, F., Luhm, R.A., Weiss, H.J., Wiedmer, T., and Sims, P.J. (1997). Scott syndrome erythrocytes contain a membrane protein capable of mediating Ca²⁺-dependent transbilayer migration of membrane phospholipids. *J. Clin. Invest.* *99*, 2232–2238.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* *199*, 1455–1465.
- Taylor, P.A. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* *99*, 3493–3499.

- Telford, W.G. (2011). Lasers in flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 102, 375–409.
- Tenorio, E.P., Fernández, J., Castellanos, C., Olgúin, J.E., and Saavedra, R. (2011). CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur. J. Immunol.* 41, 3529–3541.
- Thomas, R. (2004). Signal 3 and its role in autoimmunity. *Arthritis Research & Therapy* 6, 26.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188, 287–296.
- Tomasinsig, L., Pizzirani, C., Skerlavaj, B., Pellegatti, P., Gulinelli, S., Tossi, A., Di Virgilio, F., and Zanetti, M. (2008). The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 283, 30471–30481.
- Turk, M.J., Guevara-Patiño, J.A., Rizzuto, G.A., Engelhorn, M.E., Sakaguchi, S., and Houghton, A.N. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 200, 771–782.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Publishing Group* 8, 523–532.
- Walker, L.S.K., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 11–19.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2005). Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5126–5131.
- Weigelin, B., Krause, M., and Friedl, P. (2011). Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol. Lett.* 138, 19–21.
- Wolfson, W. (2006). Ablynx makes Nanobodies from llama bodies. *Chem. Biol.* 13, 1243– 1244.
- Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research* 61, 4766–4772.

- Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., *et al.* (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108–1113.
- Wu, A.M., and Senter, P.D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* 23, 1137–1146.
- Yano, M., Gohil, S., Coleman, J.R., Manix, C., and Pirofski, L.-A. (2011). Antibodies to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide enhance pneumococcal quorum sensing. *MBio* 2.
- Zhou, G., and Levitsky, H.I. (2007). Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *Journal of Immunology* 178, 2155–2162.
- Zinkernagel, R.M. (1996). Immunology taught by viruses. *Science* 271, 173–178.
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Publishing Group* 6, 295–307.