Institut für Immunologie

Direktor Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Vergleich von Nanobodies und konventionellen Antikörpern für die molekulare *in vivo* Bildgebung von T-Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Lennart Well
aus Kiel

unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte und
Dr. med. Peter Bannas

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.02.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	**Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte**
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:	**PD Dr. med. Harald Ittrich**
Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:	**-**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **4**

Abstract **5**

1 Einleitung **6**

1.1 ADP-Ribosyltransferase 2 **6**

1.2 Schwere-Ketten-Antikörper **7**

1.3 Nah-Infrarot-Fluoreszenzoptische Bildgebung (NIRF) **9**

2 Zielsetzung und Fragestellung **11**

3 Ergebnisse **12**

3.1 Fluorochrom konjugierte Antikörperformate in der Nah-Infrarot-Fluoreszenzoptischen Bildgebung von murinen Lymphozyten **12**

3.1.1 *In vitro* Bindung und Inhibition von ART2 durch verschiedene Antikörperformate 12

3.1.2 *In vivo* Bindung und Inhibition von ART2 12

3.1.3 Serum und Urin Analysen 13

3.1.4 *In vivo* Bildgebung der ART2 auf T Zellen axillärer und zervikaler Lymphknoten 13

3.1.5 *Ex vivo* Analysen lymphatischer Organe 14

4 Diskussion **16**

Erklärung über Art und Umfang der Mitwirkung des Promovenden **19**

Literaturverzeichnis **20**

Danksagung **25**

Lebenslauf **26**

Eidesstattliche Erklärung **28**

CONTRAST MEDIA & MOLECULAR IMAGING

Received: 12 February 2013, Revised: 15 April 2013, Accepted: 06 May 2013, Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/cmmi.1548

In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies

Peter Bannas[a,*,†], Lennart Well[a,b†], Alexander Lenz[a,b], Björn Rissiek[b], Friedrich Haag[b], Joanna Schmid[a,b], Katja Hochgräfe[c], Martin Trepel[d], Gerhard Adam[a], Harald Ittrich[a] and Friedrich Koch-Nolte[b]

The large size of conventional antibodies impedes tissue penetration and renal elimination, resulting in suboptimal *in vivo* targeting. Here we assess the utility of nanobodies and nanobody-Fc-fusion proteins as alternatives to monoclonal antibodies as theranostics, using T cell ADP–ribosyltransferase 2 (ART2) as a model antigen for specific targeting of lymph nodes. ART2-specific monovalent nanobody s + 16a (17 kDa), a bivalent Fc-fusion protein of s + 16a (s + 16-mFc, 82 kDa), and conventional antibody Nika102 (150 kDa) were labeled with AlexaFluor680. *In vitro* binding and inhibitory properties of the three AF680 conjugates were assessed by flow cytometry. For *in vivo* imaging experiments, AF680 conjugates were intravenously injected in mice lacking (KO) or overexpressing (TG) ART2. We monitored circulating and excreted AF680 conjugates in plasma and urine and performed *in vivo* near-infrared fluorescence imaging. Nanobody s + 16a^{680} and s + 16mFc^{680} *labeled* and *inhibited* ART2 on T cells in lymph nodes within 10 min. In contrast, mAb Nika102^{680} required 2 h for maximal labeling without inhibition of ART2. *In vivo* imaging revealed specific labeling of ART2-positive lymph nodes but not of ART2-negative lymph nodes with all AF680 conjugates. Even though bivalent s + 16mFc^{680} showed the highest labeling efficiency *in vitro*, the best lymph node imaging *in vivo* was achieved with monovalent nanobody s + 16a^{680}, since renal elimination of unbound s + 16a^{680} significantly reduced background signals. Our results indicate that small single-domain nanobodies are best suited for short-term uses, such as noninvasive imaging, whereas larger nanobody-Fc-fusion proteins are better suited for long-term uses, such as therapy of inflammation and tumors.
Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.
Supporting information may be found in the online version of this paper

Keywords: nanobody; antibody; near-infrared fluorescence imaging; theranostics; T cells

1. INTRODUCTION

An important endeavor in immunobiology is to develop imaging agents that can be used as therapeutic drugs, a concept termed 'theranostics' (1). Monoclonal antibodies are increasingly used for therapy and *in vivo* imaging. However, the use of conventional antibodies for specific noninvasive *in vivo* imaging is limited owing the relatively large size, which impedes tissue penetration and renal elimination (2). Both contribute to suboptimal imaging conditions with low target-to-background ratios (3). Moreover, clinical translation of molecular imaging techniques will require imaging agents with the lowest possible likelihood of toxicity and immunogenicity. One strategy for minimizing these risks is to remove unbound material from the body via renal excretion (4,5).

Nanobodies are small single-domain antigen binding fragments derived from heavy-chain antibodies that are devoid of light chains and occur naturally in camelidae (6,7). With a size of about 13–17 kDa these nanobodies are 10 times smaller than conventional antibodies (150 kDa). Recently, such nanobodies have been shown to enable specific *in vivo* molecular imaging of tumors, inflammation and the biodistribution of specific immune cells (8–13). To the best of our knowledge, there is no description of nanobodies that can be used for *in vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) imaging of immune cells and simultaneous

* *Correspondence to: P. Bannas, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department of Radiology, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. Email: p.bannas@uke.de*

† *The first two authors contributed equally.*

a *P. Bannas, L. Well, A. Lenz, J. Schmid, G. Adam, H. Ittrich*
Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Medical Center, Hamburg–Eppendorf, Germany

b *L. Well, A. Lenz, B. Rissiek, F. Haag, J. Schmid, F. Koch-Nolte*
Institute of Immunology, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf, Germany

c *K. Hochgräfe*
German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Germany

d *M. Trepel*
Department of Oncology and Hematology, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf, Germany

 Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

modulation of immune cell function, for example, by inhibition of a specific cell surface enzyme.

Here, we report the use of ADP-ribosyltransferase 2 (ART2) as a model antigen to assess the utility of immunomodulating nanobodies vs conventional antibodies as theranostic tools. Toxin-related ART2 is an ecto-enzyme expressed on murine T cells that catalyzes the transfer of ADP-ribose from NAD^+ onto target proteins on the cell surface, which induces apoptosis of T cells, leading to selective depletion of T cell subsets (14–16). Activity of ART2 can be monitored with the Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-analog etheno-NAD as substrate and the ethenoadenosine-specific monoclonal antibody 1G4 to detect etheno-ADP-ribosylated proteins on the cell surface (16–18). Recent studies revealed that the activity of ART2 and ART2-mediated selective depletion of T cell subsets can be inhibited by a blocking single-domain nanobody (s + 16a) *in vitro* and *in vivo* (14,19). Moreover, a reformatted nanobody-Fc-fusion protein (s + 16mFc) has been shown to mediate long-term *in vivo* inhibition of ART2 activity and thereby to retard development of autoimmune diabetes in a mouse model (20).

A single nanobody-based probe for noninvasive imaging and simultaneous immunomodulation would be a desirable tool for experimental as well as for clinical applications. In our study, the recently developed ART2-specific monovalent nanobody s + 16a (17 kDa) and the bivalent s + 16mFc-fusion protein (82 kDa) were compared with the conventional monoclonal antibody Nika102 (150 kDa) for their capacity to inhibit and noninvasively image ART2 on T cells using near-infrared-fluorescence imaging *in vivo*.

2. RESULTS

2.1. Labeling and Inhibition of ART2 *in vitro*

Nanobody, nanobody-Fc-fusion protein and conventional antibody were conjugated with AlexaFluor680 (Fig. 1). Flow cytometry revealed specific binding of s + 16a^{680}, s + 16mFc^{680} and Nika102^{680} to ART2 on T cells of BALB/c wild-type (WT) mice and of transgenic mice overexpressing ART2 (TG), but not of ART2-deficient (KO) mice (Fig. 2). The results showed an intermediate level of ART2 on WT T cells and a high level on most, but not all, TG T cells. The monovalent single domain nanobody s + 16a^{680} stained T cells slightly less efficiently than the bivalent Fc-fusion protein s + 16mFc^{680} and the conventional antibody Nika102^{680}. Concomitant monitoring of the enzymatic activity of ART2 with AlexaFluor488-conjugated mAb 1G4 (17) revealed an almost complete inhibition of the enzymatic activity of ART2 on T cells by s + 16a^{680} and s + 16mFc^{680}, but only a slight reduction by mAb Nika102^{680} (Fig. 2b). Control cells from ART2-deficient mice (21) did not show any detectable ART activity, consistent with the lack of ART2 expression on these cells (Fig. 2a, b).

To test the validity of the planned *in vivo* NIRF-imaging experiments we determined the correlation of ART2 staining with flow cytometry and NIRF-imaging (Supporting Information, Fig. 1). Regarding ART2-transfected cells, both techniques showed similar dose-dependent labeling and saturating levels for each of the AF680 conjugates. The two techniques showed a strong correlation ($r = 0.975$). Untransfected cells did not show any detectable signal with Fluorescence activated cell sorting (FACS) or NIRF imaging.

2.2. Labeling and Inhibition of ART2 *in vivo*

T cells from lymph nodes were purified at different time points after injection of 50 μg s + 16a^{680}, s + 16mFc^{680} or Nika102^{680} (corresponding approximately to 3000, 600 and 300 pmol, respectively) and analyzed by flow cytometry for ART2-labeling efficiency. For analysis of ART2-inhibition, T cells were incubated with or without 10 μM etheno-NAD and stained with the etheno-adenosine specific antibody 1G4. Results of *ex vivo* FACS analyses revealed that the smaller constructs s + 16a^{680} and s + 16mFc^{680} reached maximal labeling of ART2 on lymph node cells within 10 min, whereas the larger mAb Nika102^{680} reached maximal labeling of ART2 only after 2 h (Fig. 3a). Labeling with the bivalent s + 16mFc^{680} and Nika102^{680} was constant for 12 h, whereas labeling with monovalent s + 16a^{680} declined after 2 h. Consistently, s + 16a^{680} and s + 16mFc^{680} showed an inhibition of >90% of ART2-activity within 1–2 h (Fig. 3b). Mice injected with s + 16mFc^{680} showed persistent inhibition of ART2-activity for 12 h (>90%), whereas inhibition by s + 16a^{680} declined to 20% at 12 h after injection. In contrast, mAb Nika102^{680} showed little if any inhibition of ART2-activity. Serum analyses revealed a continuous decline of free s + 16a^{680} with an apparent serum half-life of 1–2 h, whereas the larger fusion protein s + 16mFc^{680} and mAb Nika102^{680} showed little if any loss from circulation for 12 h (Fig. 3c).

2.3. Serum and Urine Analyses

We performed comparative titration analyses to optimize the concentration of the AF680 conjugates for *in vivo* imaging experiments (Supporting Information, Fig. 2). At 2 h post injection of the highest antibody dose (50 μg), serum samples from both ART2-TG and ART2-KO mice showed high levels of unbound circulating s + 16Fc^{680} and Nika102^{680}, but little if any unbound s + 16^{680} (Supporting Information, Fig. 2a, c). Urine analyses revealed high levels of s + 16a^{680}, but little if any

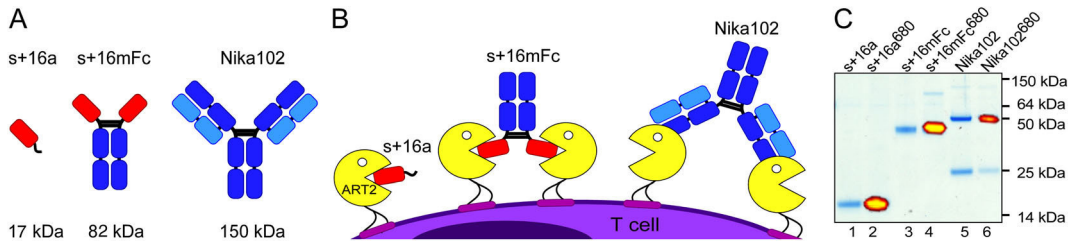

Figure 1. ART2-specific AF680 conjugates. (a) Scheme of nanobody s + 16a, nanobody-Fc-fusion protein s + 16mFc, and mAb Nika102. (b) The deep, NAD^+-binding active site crevice of ART2 is symbolized by the mouth of a 'Pacman'. Both, s + 16a and s + 16mFc block the active site of ART2. Conventional mAb Nika102 binds outside the active site and does not inhibit ART2 activity. (c) Coomassie stained gel overlaid by a corresponding near-infrared fluorescence (NIRF)-image of unconjugated s + 16a, s + 16mFc, and Nika102 (lanes 1, 3 and 5) and respective AF680 conjugates (lanes 2, 4 and 6).

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

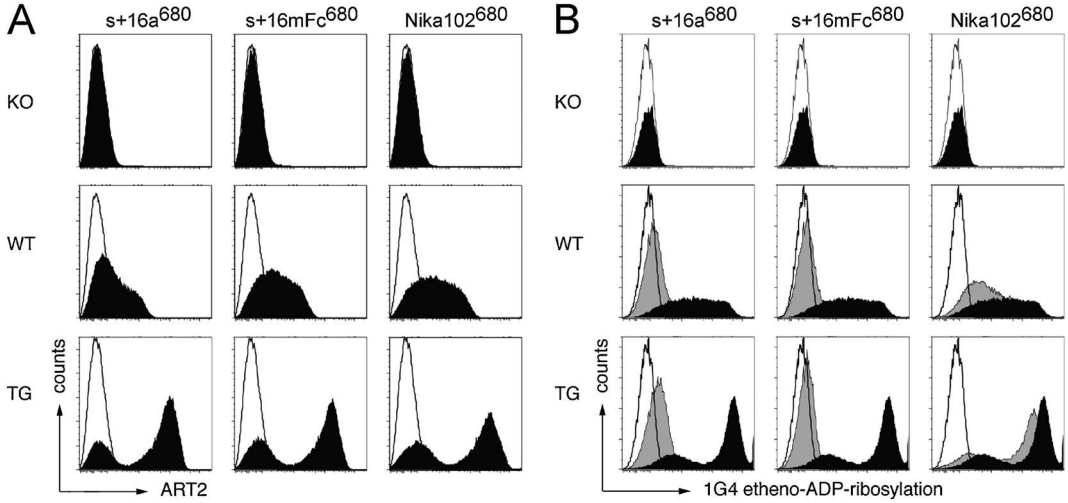

Figure 2. Analyses of ART2-expression and activity. (a) Lymph node cells from ART2-knockout mice (KO), ART2-wild-type mice (WT) and from transgenic mice overexpressing ART2 (TG) were stained with the indicated AF680 conjugates and subjected to FACS analyses. Mean fluorescence intensities of T cells are plotted (solid histograms). Open histograms show isotype controls. (b) Parallel aliquots of cells were pre-incubated in the absence (solid black histograms) or presence (solid gray histograms) of the indicated AF680 conjugates. Cells were then further incubated in the presence of etheno-NAD before detection of etheno-ADP-ribosylated cell surface proteins with mAb 1G4. Control stainings were performed in the absence of etheno-NAD (open histograms). Results are representative of three independent experiments

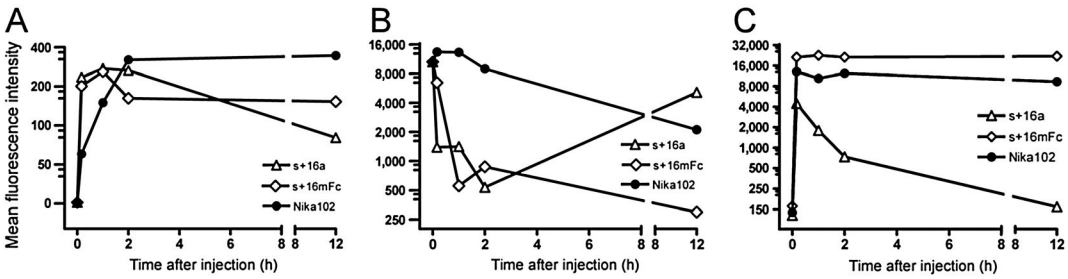

Figure 3. Staining and inhibition of ART2 *in vivo* after injection of AF680 conjugates. Wild-type mice were injected intravenously with 50μg of s + 16a^{680}, s + 16mFc^{680} or Nika102^{680} and sacrificed at the indicated time points. (a) Lymph node cells were subjected to flow cytometry to detect cell surface-bound AF680 conjugates. (b) Parallel aliquots of cells were incubated with 10 μM etheno-NAD for 10 min, washed and stained with 1G4-mAb to monitor ART2 enzyme activity. (c) Serum was analyzed to monitor levels of circulating unbound AF680 conjugates. Results are representative of two independent experiments.

s + 16mFc^{680} and mAb Nika102^{680} (Supporting Information, Fig. 2b, d). At lower doses (5 μg, 0.5 μg), unbound s + 16-Fc and Nika102 were detectable in serum samples of ART2-KO mice, but not in ART2-TG mice.

2.4. *In vivo* NIRF Imaging Experiments

In order to reduce background signals by unbound circulating antibody conjugates, we used 50 μg of s + 16a^{680}, 5 μg of s + 16mFc^{680} and 10 μg of Nika102^{680} (corresponding to 3000, 60 and 60 pmol or 5×10^{14}, 8×10^{13} 6×10^{14} fluorescent dyes per animal, respectively) in these experiments, using the results shown above for guidance. Fluorescence of cervical and axillary lymph nodes was visible in ART2-TG mice after injection of all three conjugates (Fig. 4a). While s + 16mFc^{680} and Nika102^{680} showed strong background fluorescence, there was no background signal in the case of s + 16a^{680}. The clearest images showing high fluorescence of lymph nodes were obtained 2 h post injection of s + 16a^{680} and, in case of the mAb Nika102^{680}, only after 24 h. The Fc-fusion protein s + 16mFc^{680} showed detectable lymph node fluorescence, albeit only slightly above background. Of note, at 24 h after injection of the fusion protein s + 16mFc^{680} and mAb Nika102^{680}, ART2-TG mice showed less diffusely distributed fluorescence than ART2-KO mice. At this time point, none of the mice injected with the s + 16a^{680} showed any detectable background signals.

Semiquantitative analyses of fluorescence intensities of lymph node regions over 24 h confirmed rapid labeling by s + 16a^{680} with a maximal signal 1 h after injection (Fig. 4b). In ART2-KO mice this was followed by a rapid decline in signal intensity. The much slower decline of signal intensity of lymph nodes in ART2-TG mice injected with s + 16a^{680} resulted in high target-to-background ratios from 2 to 24 h.

In contrast, injection of s + 16mFc^{680} and mAb Nika102^{680} yielded maximal lymph node fluorescence only at 2–4 h after injection with signal intensities remaining nearly constant thereafter over 24 h. The lower lymph node signal intensities in mice injected with s + 16mFc^{680} and mAb Nika102^{680} vs s + 16a^{680} are consistent with the amounts of injected conjugates. Labeling of TG lymph nodes was clear and distinguishable

 Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

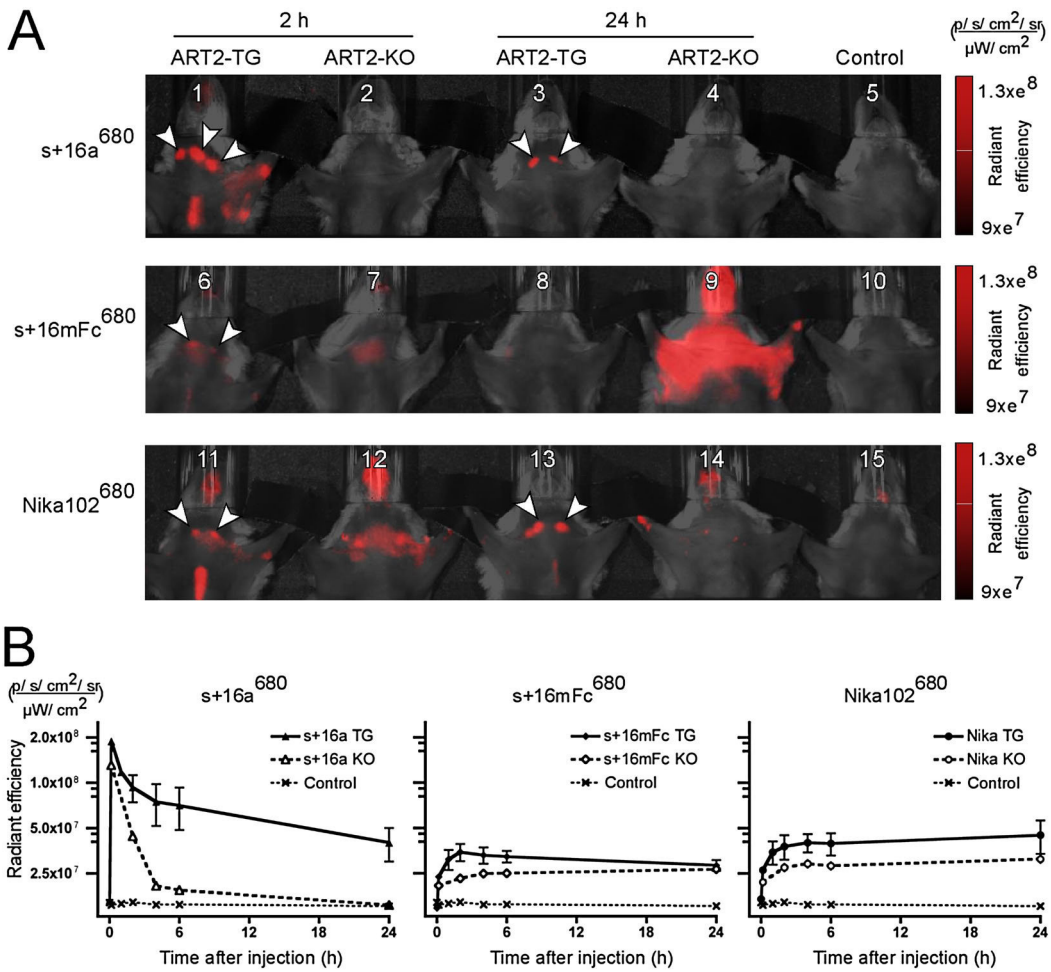

Figure 4. *In vivo* NIRF-imaging. (a) ART2-TG mice and ART2-KO mice were injected with buffer (control), 50 µg s + 16a^{680}, 5 µg s + 16mFc^{680} or 10 µg Nika102^{680}. Groups of control and antibody-injected mice (2 and 24 h after injection) were then subjected to simultaneous NIRF imaging to obtain visually comparable images. Arrowheads indicate cervical and axillary lymph nodes. (b) Radiant efficiencies of regions of interest of lymph nodes are plotted as a function of time for control mice and mice injected with s + 16a^{680}, s + 16mFc^{680} and Nika102^{680}. Data are presented as means ± SD from four independent experiments.

compared to KO lymph nodes for all AF680 conjugates at all imaging time points. However, the difference in labeling intensity of TG vs KO lymph nodes was far higher for s + 16a^{680} than for the larger conjugates s + 16mFc^{680} and Nika102^{680} for the entire period from 2 to 24 h.

2.5. *Ex vivo* NIRF Imaging Experiments

In order to evaluate whether and to what extent the diffuse fluorescence observed (stronger in ART2-KO than in ART2-TG mice) after injection of the larger AF680 conjugates is attributed to unbound circulating antibodies, serum samples were analyzed for the presence of free AF680 conjugates at the time of sacrifice (Supporting Information, Fig. 3a, b). The results revealed higher levels of unbound s + 16mFc^{680} and mAb Nika102^{680} in ART2-KO than in ART2-TG mice already 2 h after injection (Supporting Information, Fig. 3 a). At 24 h after injection, no detectable unbound AF680 conjugates remained in ART2-TG mice, while ART2-KO mice still showed high levels of unbound s + 16mFc^{680} and Nika102^{680} (Supporting Information, Fig. 3 b). Concomitant analyses of urine samples revealed that renal excretion of s + 16a^{680} is terminated 24 h after injection (Supporting Information, Fig. 3, compare c and d).

To further validate the *in vivo* NIRF-imaging data, harvested lymph nodes were imaged *ex vivo* (Fig. 5). *Ex vivo* NIRF-imaging of isolated lymph nodes (Fig. 5a) confirmed specific labeling of cervical and axillary lymph nodes in ART2-TG mice but not in ART2-KO mice with all conjugates. Fluorescence intensities of lymph nodes obtained from ART2-TG mice injected with s + 16a^{680} were 5–13 times higher than those from mice injected with s + 16mFc^{680} and Nika102^{680} (Fig. 5b, Table 1). The results confirm the decline of lymph node fluorescence 24 h after injection of s + 16a-AF680, whereas lymph node fluorescence from ART2-TG mice remained constant from 2 to 24 h after injection of the larger AF680 conjugates (Fig. 5b, Table 1). At 2 h after injection all three AF680 conjugates showed significant differences in lymph node signals from ART2-TG and ART2-KO mice, whereas after 24 h only s + 16a^{680} and Nika102^{680} still showed significant differences.

Analyses of spleen, lung, liver, kidneys, stomach and muscle tissue (Table 1) showed that signals from spleen reflect those described above for lymph nodes with significant

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

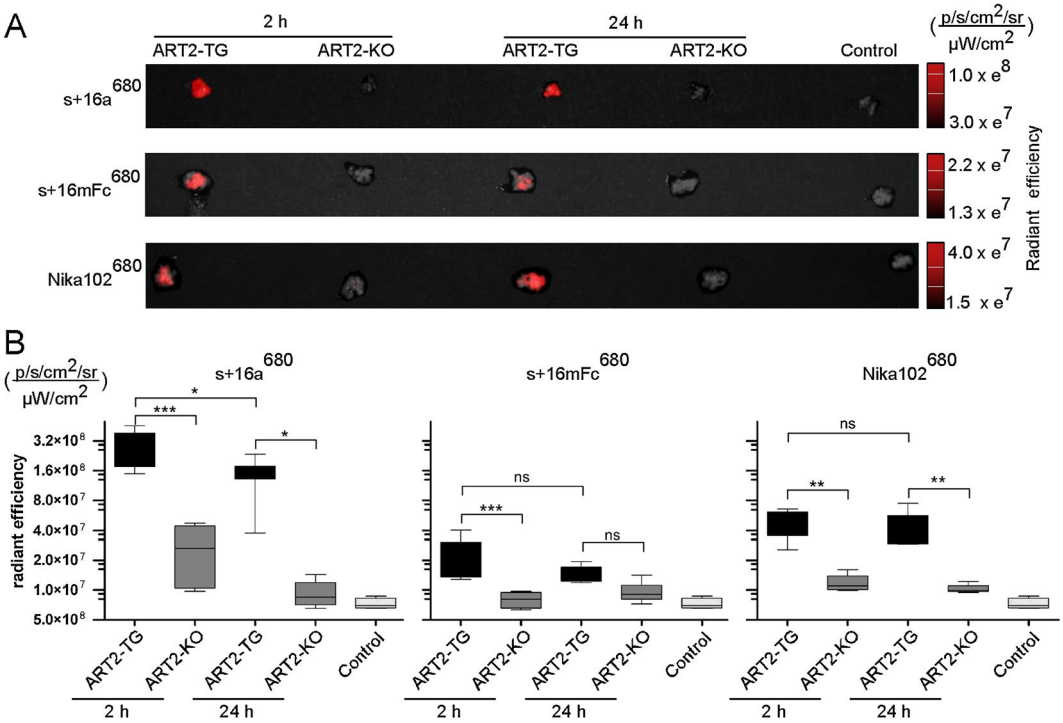

Figure 5. *Ex vivo* NIRF-imaging. (a) In order to quantitate lymph node associated fluorescence in the absence of potentially confounding signals from other tissues, lymph nodes (four axillary, two cervical and two inguinal) were dissected and pooled for direct NIRF-imaging. (b) Radiant efficiencies of pooled lymph nodes are presented as means ± SD from four independent experiments.

Table 1. *Ex vivo* radiant efficiencies of individual organs. Radiant effects ($\times 10^{10}$) are presented as means ± SD. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA and Bonferroni post tests. n.s., Not significant. *p*-Values are given for results of organs from ART2-transgenic (TG) vs ART2-knockout (KO) mice

Time point	Construct	Animals	Lymph nodes	Spleen	Lung	Liver	Kidneys	Stomach	Muscle
2 h p.i.	**s + 16a**	**TG**	27.9 ± 6.7	17.0 ± 2.5	6.4 ± 1.2	34.4 ± 3.4	432.3 ± 63.8	17.9 ± 4.1	2.5 ± 0.6
		KO	2.8 ± 1.0	1.2 ± 0.2	2.9 ± 0.6	13.6 ± 3.3	406.0 ± 20.4	13.4 ± 4.6	1.0 ± 0.2
		p	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	n.s.	n.s.	<0.05
	s + 16mFc	**TG**	2.11 ± 0.4	5.8 ± 1.3	2.3 ± 0.2	8.7 ± 1.7	3.0 ± 0.4	19.0 ± 10.2	0.6 ± 0.1
		KO	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1	7.2 ± 1.0	2.4 ± 0.2	4.0 ± 0.3	0.7 ± 0.4
		p	<0.001	<0.001	<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Nika102	**TG**	4.9 ± 0.9	11.6 ± 2.1	2.9 ± 0.5	6.7 ± 0.9	2.8 ± 0.3	4.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1
		KO	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	3.8 ± 0.4	10.4 ± 2.1	4.0 ± 0.5	4.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1
		p	<0.01	<0.001	n.s.	n.s.	<0.05	n.s.	n.s.
24 h p.i.	**s + 16a**	**TG**	15.0 ± 2.3	6.1 ± 1.0	1.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	10.6 ± 2.4	5.3 ± 0.8	0.7± 0.1
		KO	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.5 ± 0.5	12.4 ± 7.1	4.4 ± 1.1	0.9 ± 0.1
		p	<0.05	<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	s + 16mFc	**TG**	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.1 ± 0.2	0.6 ± 0.4
		KO	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.2	3.5 ± 0.7	1.9 ± 0.2	4.7 ± 0.7	0.7 ± 0.3
		p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Nika102	**TG**	3.9 ± 0.7	5.5 ± 0.7	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1
		KO	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.9 ± 0.4	2.0 ± 0.1	3.7 ± 0.5	0.7 ± 0.1
		p	<0.01	<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

differences in fluorescence signals between ART2-TG and ART2-KO mice after 2 h for all three AF680 conjugates. Lung, liver and muscle showed significant differences in fluorescence only at 2 h after injection of s + 16a^{680}. At 24 h after injection of s + 16a^{680} and Nika102^{680}, lung, liver, kidney, stomach and muscle organs from ART2-TG vs ART2-KO mice did not show any significant differences in fluorescence while lymph nodes and spleen (Table 1) still showed significant differences. Highest signal intensity was observed in kidneys 2 h after injection of s + 16a^{680}.

 Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

3. DISCUSSION

In this study we report that simultaneous immunomodulation and molecular imaging of T cells *in vivo* is achievable with nanobodies. We used AF680-conjugated nanobodies to link *in vivo* analyses by NIRF-imaging to *ex vivo* cell discriminating assays by flow cytometry. Our results demonstrate that monovalent s + 16a^{680} and bivalent s + 16mFc^{680} allow specific labeling and inhibition of ART2 on T cells *in vitro* and *in vivo*. Even though s + 16mFc^{680} had the highest labeling efficiency *in vitro*, best lymph node imaging *in vivo* was achieved with nanobody s + 16a^{680}.

Specific labeling and imaging of cells with antibody conjugates directed against cell surface proteins is more challenging *in vivo* than *in vitro*. *In vitro*, conjugates have direct access to their target cells and excess conjugates can readily be removed by washing cells, yielding highly specific signals. *In vivo*, conjugates need to cross barriers to reach their target and unbound conjugates cause background signals until they are removed from the system, for example, by renal or biliary excretion (4,5). Our results indicate that the format of an antibody conjugate governs its capacity to cross barriers and its removal from the system, thereby profoundly affecting the signal-to-background ratio and the optimal time point for *in vivo* imaging.

An ideal targeted imaging agent should be able to penetrate the tissue, bind to specific cell surface antigens with sufficient affinity to be retained in the target tissue and to be cleared rapidly from the circulation to enable imaging in a reasonable timescale (4,5). The rapid renal clearance of s + 16a^{680} allowed us to use high concentrations of s + 16a (50 μg or 3000 pmol) for *in vivo* NIRF-imaging experiments. Comparative analyses of unbound conjugates in sera of ART2KO and ART2TG mice allowed us to adjust the dosage of bivalent s + 16mFc (5 μg or 60 pmol) and Nika102 (10 μg or 60 pmol) conjugates to minimize levels of circulating antibodies while still permitting good staining of lymph node cells. To assess potential retention and metabolism of A680 conjugates by other organs, we performed region of interest (ROI)-based quantification from isolated organs. The results revealed the highest signal in kidneys of mice 2 h after injection of s + 16a^{680}, reflecting its renal excretion. Relatively high signals were also observed in the spleen of ART2-transgenic but not ART2-deficient mice, consistent with the high content of ART2 $^{+}$ T cells in the spleen. Signals from the liver in both ART2-transgenic and ART2-deficient mice could be due to partial biliary elimination of AF680 conjugates and depleted fluorescent dye alone.

Our results are in accordance with previous studies, where large, intact IgG antibody molecules with proven therapeutic benefit demonstrated limited utility in molecular imaging owing to their slow clearance from circulation and tissues, resulting in limited imaging contrast early after injection owing to a high background signal (2). This limitation can be overcome by engineering antibody fragments (nanobodies) that retain specific binding to the target antigen and at the same time achieve fast blood clearance (9,12). It is conceivable that imaging of ART2 + cells could be enhanced further via dimerization of the nanobody, for example, by genetic fusion or by disulfide linkages, which could enhance the avidity of the probe for the target cells while at the same time retaining elimination via the kidney. While these nanobodies are ideally suited for imaging applications, their rapid renal elimination limits their use for long-term therapeutic applications. To this end it would be desirable to increase their apparent size to over 65 kDa to bypass kidney filtration (20,22). This can be achieved by various antibody engineering strategies, such as, multimerization, fusion to other antibody fragments or creation of bi-specific sdAbs, where one fragment binds to a plasma carrier, such as albumin, to increase the serum half-life (20,22–25). In accord with a previous study (20), increasing the size by fusing the nanobody s + 16a to the Fc domain of murine IgG1 improved and prolonged the immunomodulatory properties *in vivo*. Inhibition of ART2 by s + 16a protects regulatory T cells and iNKT cells from acute NAD-induced cell death, whereas s + 16-Fc provides persistent protection (14,20). It will be interesting to determine whether the imaging techniques presented here will be theranostically useful in models of acute inflammatory reactions such as ConA-induced hepatits (26) and chronic inflammatory reactions such as autoimmune diabetes (20).

An inherent technical limitation of NIRF-imaging is its low penetration depth of 7–10 mm owing to the absorbance and scattering of light within biological tissues, resulting in lower sensitivities than radioimmunological methods. Currently, these limitations are addressed by the development of tomographic photo-acoustic techniques allowing whole-body imaging of living mice (27). Besides these limitations, NIRF-imaging provides several advantages compared with other established pre-clinical imaging techniques, such as computed tomography, magnetic resonance imaging, and nuclear imaging (3,28). NIRF imaging is nonradioactive, highly sensitive and relatively inexpensive, and the targeted probes are comparatively easy to produce and store (29,30). Our results demonstrated that NIRF-conjugated nanobodies have excellent properties for rapid preclinical optical imaging, which holds promise for their future use as diagnostic tools in humans. Moreover, the presented NIRF imaging techniques can be easily translated to immuno-PET (Positron emission tomography) imaging by radiolabeling of nanobodies. A recent PET study confirmed faster kinetics of radiolabeled nanobodies, allowing high contrast imaging at early time points in comparison with radiolabeled conventional monoclonal antibodies (12). Also the therapeutic aspects of nanobodies have been highlighted in a recent study, where radiolabeled nanobodies have been modified to extend their serum half-life for optimized tumor therapy (25).

4. CONCLUSIONS

In this study we illustrated NIRF-imaging with nanobodies as a powerful tool to detect immune cells *in vivo* and to simultaneously modulate their function, highlighting the potential utility of nanobodies as theranostics. The techniques described here may serve as a model for other nanobody-based applications: small single domain nanobodies are best suited for short-term uses, for example, noninvasive imaging, whereas larger nanobody-Fc-fusion proteins are better suited for long-term uses, for example, therapy of inflammation and tumors.

5. EXPERIMENTAL

5.1. Chemicals, Cells and Mice

Etheno-NAD was obtained from Sigma-Aldrich. Phycoerythrin (PE)- and Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

antibodies were purchased from BD Pharmingen. Mouse monoclonal antibody 1G4 (17) was conjugated to fluorochrome Alexa488 as described previously (18). Untransfected and ART2-transfected DC27.10 mouse lymphoma cells were cultured as described previously (16). BALB/c wild-type mice were obtained from the Jackson Laboratory. Generation of ART2-deficient mice and of transgenic mice with overexpression of ART2 on T cells was described previously (21,31). Animal experiments were performed in accordance with international guidelines on the ethical use of animals and were approved by the local animal welfare commission.

5.2. Generation of ART2-Specific AF680 Conjugates

Generation and purification of nanobody s + 16a (19), Fc-Fusion protein s + 16mFc (20) and of monoclonal antibody Nika102 (32) were described previously. ART2 specific probes were conjugated by random reaction of primary amines to the succinimidyl ester moiety of fluorescent dye AlexaFluor-680 (AF680) (excitation wavelength 679 nm, emission wavelength 702 nm). The numbers of dye molecules per probe (0.3, 1.2 and 2.0 for s + 16a, s + 16mFc and Nika102, respectively) were calculated according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes; using molar extinction coefficients of 15 720, 51 170 and 203 000 $mol^{-1} cm^{-1}$, respectively). Purity of antibody constructs before and after conjugation to AF680 was assessed by SDS–PAGE size fractionation and Coomassie Brilliant Blue gel stain (Fig 1). Binding affinities before and after conjugation as well as stability during overnight incubation at 37 °C in serum were assessed by serial dilution of probes and flow cytometry of DC27.10 cells. Binding affinities were 10 nM for Nika102, 5 nM for s + 16mFc and 40 nM for s + 16a. The results showed less than 10% reduction in labeling efficiencies (mean fluorescent intensity) upon conjugation and overnight incubation in serum (results not shown).

5.3. Analysis of ART2 Expression and Enzymatic Activity

Mice were sacrificed by exposure to O_2/CO_2 followed by cervical dislocation. Single-cell suspensions were prepared from lymph nodes as described previously (31). For ART2-expression analyses, cells (1×10^6) were stained with s + 16a, s + 16mFc and Nika102 AF680 conjugates (1 μg ml^{-1}) or AF680-control antibodies and counterstained with PE-anti-CD3 for 20 min at 4 °C.

For ART2-activity analyses, cells (1×10^6) were pre-incubated in the presence or absence of s + 16a, s + 16mFc and Nika102 AF680 conjugates (1 μg ml^{-1}) and then with or without 1 μM etheno-NAD for 20 min at 4 °C. Cells were washed twice and stained with ethenoadenosine-specific mAb Alexa488-1G4 (1 μg ml^{-1}) and counterstained with PE-anti-CD3. Cells were washed twice and analyzed by flow cytometry on FACSCantoII. Dead cells were excluded after staining with propidium iodide.

5.4. *In vitro* NIRF Imaging

An aliquot of 1.1×10^7 of untransfected or ART2-transfected DC27.10 cells was incubated with different concentrations of s + $16a^{680}$, s + $16mFc^{680}$ or $Nika102^{680}$ for 30 min at 4 °C and washed twice. An aliquot of 1×10^7 cells was sedimented on a black 96-well plate (Nunc). Measurements were performed with a whole-body small-animal NIRF imaging system (IVIS-Spectrum, Caliper LifeSciences) using the 675 nm band-pass (30 nm bandwidth) filter for excitation and the 720, 740, 760 and 780 nm band-pass filters (20 nm bandwidth) for emission with a 512 × 512 pixel matrix size (15 × 15 μm per pixel). Images were analyzed semi-quantitatively by placing a ROI on individual wells. Total radiant efficiency was calculated with Living Image 4.2 software (Caliper LifeSciences). An aliquot of 1×10^6 cells was subjected to flow cytometry for comparative analysis.

5.5. Analyses of AF680 Conjugates After Intravenous Injection

An aliquot of 50 μg of s + $16a^{680}$, s + $16mFc^{680}$ or $Nika102^{680}$ (corresponding to approximately 3000, 600 and 300 pmol, respectively) in a volume of 200 μl was administered intravenously into BALB/c wild-type mice. T cells from lymph nodes were purified at different time points after injection. For flow cytometric analysis of ART2-labeling efficiency, purified T cells were counterstained with PE-anti-CD3. For analysis of ART2-inhibition by the different AF680 conjugates, T cells were incubated with or without 10 μM etheno-NAD, washed twice and stained with Alexa488-1G4 and PE-anti-CD3.

To measure blood clearance and renal excretion of AF680 conjugates, mice were sacrificed at different time points post injection and blood and urine were collected. AF680 conjugates were quantified by flow cytometry using serum (1:100 dilution) and urine (1:100 dilution) in a total volume of 100 μl for labeling 1×10^6 ART2-expressing DC27.10 cells. For assessment of optimal *in vivo* imaging conditions, AF680 conjugate concentrations of 0.5, 5 or 50 μg of s + $16a^{680}$, s + $16mFc^{680}$and $Nika102^{680}$ were injected intravenously into wild-type mice. Animals were sacrificed at different time points after injection and free abundant AF680 conjugates in serum and urine were quantified as described above.

5.6. *In vivo* and *ex vivo* NIRF Imaging

ART2-deficient and ART2-overexpressing mice were maintained on an alfalfa-free diet for 2 weeks prior to imaging experiments. The day prior to the imaging experiment the ventral and lateral throat, thorax and abdomen were depilated. For imaging experiments 50 μg s + $16a^{680}$, 5 μg s + $16mFc^{680}$ and 10 μg of $Nika102^{680}$ (corresponding to approximately 3000, 60 and 60 pmol, respectively) were administered intravenously in a volume of 200 μl. Mice were anesthetized with isofluorane and positioned in the imaging chamber, allowing for maintenance of gaseous anesthesia. NIRF-imaging was performed before and 10 min and 1, 2, 4, 6 and 24 h after injection. Imaging parameters were the same as for *in vitro* imaging experiments. Radiant efficiency was estimated using manually drawn ROIs around the four brightest cervical and axillary lymph node regions.

To validate the *in vivo* data, animals were sacrificed 2 or 24 h after injection. NIRF imaging was performed of harvested lymph nodes, spleens, lungs, livers, kidneys, muscle tissue and stomachs, and radiant efficiencies were estimated.

5.7. Statistical Analysis

To assess the validity of semiquantitative results from NIRF imaging, radiant efficiency measurements from NIRF imaging *in vitro* experiments were compared with mean fluorescence intensities from flow cytometry using Pearson's correlation coefficient. All presented radiant efficiency data were calculated from four independent experiments. A one-way ANOVA with a subsequent Bonferroni *post hoc* analysis was used to determine significant differences between measurements obtained at different time points and between measurements obtained from ART2-expressing and ART2-deficient animals. A value of $p < 0.05$ indicates statistical significance. Data are presented as means ± standard deviations. Statistical analysis was performed using Prism 4 for Macintosh and Excel, Microsoft.

 Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information can be found in the online version of this article.

Acknowledgments

Parts of this work represent partial fulfillment of the requirements for the graduate thesis of Lennart Well and Alexander Lenz at the University Hospital, Hamburg. This work was supported by the Werner-Otto-Foundation (Peter Bannas) and by the Wilhelm-Sander-Foundation (Peter Bannas and Friedrich Koch-Nolte). We thank Valentin Kunick for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Lee DY, Li KC. Molecular theranostics: a primer for the imaging professional. Am J Roentgenol 2011; 197(2): 318–324.
2. Lisy MR, Goermar A, Thomas C, Pauli J, Resch-Genger U, Kaiser WA, Hilger I. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in mice. Radiology 2008; 247(3): 779–787.
3. Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. J Clin Oncol 2008; 26(24): 4012–4021.
4. Choi HS, Liu W, Liu F, Nasr K, Misra P, Bawendi MG, Frangioni JV. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. Nat Nanotechnol 2010; 5(1): 42–47.
5. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. Renal clearance of quantum dots. Nat Biotechnol 2007; 25(10): 1165–1170.
6. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 1993; 363(6428): 446–448.
7. 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; 198(3): 157–174.
8. Zaman MB, Baral TN, Jakubek ZJ, Zhang J, Wu X, Lai E, Whitfield D, Yu K. Single-domain antibody bioconjugated near-IR quantum dots for targeted cellular imaging of pancreatic cancer. J Nanosci Nanotechnol 2011; 11(5): 3757–3763.
9. De Groeve K, Deschacht N, De Koninck C, Caveliers V, Lahoutte T, Devoogdt N, Muyldermans S, De Baetselier P, Raes G. Nanobodies as tools for *in vivo* imaging of specific immune cell types. J Nucl Med 2010; 51(5): 782–789.
10. Tchouate Gainkam LO, Keyaerts M, Caveliers V, Devoogdt N, Vanhove C, Van Grunsven L, Muyldermans S, Lahoutte T. Correlation between epidermal growth factor receptor-specific nanobody uptake and tumor burden: a tool for noninvasive monitoring of tumor response to therapy. Mol Imag Biol 2011; 13(5): 940–948.
11. Ta HT, Prabhu S, Leitner E, Jia F, von Elverfeldt D, Jackson K, Heidt T, Nair A, Pearce H, von Zur Muhlen C, Wang X, Peter K, Hagemeyer CE. Enzymatic single-chain antibody tagging: a universal approach to targeted molecular imaging and cell homing in cardiovascular disease. Circul Res 2011; 109(4): 365–373.
12. Vosjan MJ, Perk LR, Roovers RC, Visser GW, Stigter-van Walsum M, van Bergen En Henegouwen PM, van Dongen GA. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with 68Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. Eur J Nucl Med Mol Imag 2011; 38(4): 753–763.
13. Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, van Diest PJ, van Bergen en Henegouwen PM. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti- epidermal growth factor receptor nanobody. Mol Imag Biol 2012; 11(1): 33–46.
14. 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; 207(12): 2561–2568.
15. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. Immunity 2003; 19(4): 571–582.
16. Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F. Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. Blood 2005; 105(9): 3663–3670.
17. Krebs C, Koestner W, Nissen M, Welge V, Parusel I, Malavasi F, Leiter EH, Santella RM, Haag F, Koch-Nolte F. Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. Anal Biochem 2003; 314(1): 108–115.
18. Bannas P, Graumann O, Balcerak P, Peldschus K, Kaul MG, Hohenberg H, Haag F, Adam G, Ittrich H, Koch-Nolte F. Quantitative magnetic resonance imaging of enzyme activity on the cell surface: in vitro and *in vivo* monitoring of ADP-ribosyltransferase 2 on T cells. Mol Imag 2010; 9(4): 211–222.
19. Koch-Nolte F, Reyelt J, Schossow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A, Goldbaum FA. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 *in vivo*. FASEB J 2007; 21(13): 3490–3498.
20. 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; 34(2): 145–154.
21. Ohlrogge W, Haag F, Lohler J, Seman M, Littman DR, Killeen N, Koch-Nolte F. Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. Mol Cell Biol 2002; 22(21): 7535–7542.
22. Iqbal U, Trojahn U, Albaghdadi H, Zhang J, O'Connor-McCourt M, Stanimirovic D, Tomanek B, Sutherland G, Abulrob A. Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours. Br J Pharmacol 2010; 160(4): 1016–1028.
23. Roovers RC, van Dongen GA, van Bergen en Henegouwen PM. Nanobodies in therapeutic applications. Curr Opin Mol Ther 2007; 9(4): 327–335.
24. Vosjan MJ, Vercammen J, Kolkman JA, Stigter-van Walsum M, Revets H, van Dongen GA. Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. Mol Cancer Ther 2012; 11(4): 1017–1025.
25. Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, El Khoulati R, de Bruin RC, Ferguson KM, Verkleij AJ, van Dongen GA, van Bergen En Henegouwen PM. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. Int J Cancer 2011; 129(8): 2013–2024.
26. Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Govindarajan S, Dennert G. P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. J Immunol 2006; 176(4): 2152–2160.
27. Razansky D, Buehler A, Ntziachristos V. Volumetric real-time multispectral optoacoustic tomography of biomarkers. Nat Protoc 6(8): 1121–1129.
28. Hoffman JM, Gambhir SS. Molecular imaging: the vision and opportunity for radiology in the future. Radiology 2007; 244(1): 39–47.
29. Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. *In vivo* imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. Blood 2011; 118(13): e93–e100.
30. Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. Nat Med 2003; 9(1): 123–128.
31. Bannas P, Scheuplein F, Well L, Hermans-Borgmeyer I, Haag F, Koch-Nolte F. Transgenic overexpression of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 sensitizes T cells but not B cells to NAD-induced cell death. Mol Immunol 2011; 48(15–16): 1762–1770.
32. Koch-Nolte F, Duffy T, Nissen M, Kahl S, Killeen N, Ablamunits V, Haag F, Leiter EH. 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. J Immunol 1999; 163(11): 6014–6022.

 Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Zusammenfassung

Die ADP-Ribosyltransferase 2 (ART2) ist ein auf murinen T Lymphozyten exprimiertes, toxin-verwandtes Ekto-Enzym. Unter Verwendung seines Substrates Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) kann es Zelloberflächenproteine mit ADP-Riboseresten modifizieren. Effekte dieser ADP-Ribosylierung sind der Abwurf (Shedding) von Oberflächenproteinen und der NAD induzierte Zelltod (NICD). Um eine bessere Beurteilbarkeit der von ART2 ausgelösten Effekte zu gewährleisten, wurden von unserer Arbeitsgrupppe ART2 defiziente (ART2 KO) und ART2 überexprimierende, transgene (ART2 TG) Mauslinien etabliert.

In dieser Dissertation wurden die Pharmakokinetik, Biodistribution, sowie die inhibierenden und bildgebenden Eigenschaften von drei gegen ART2 gerichteten Antikörperformaten in der Nah-Infrarot-Fluoreszenzoptischen Bildgebung (NIRF) analysiert. Hierbei sollte festgestellt werden, welches der verwendeten Konstrukte sowohl dem Anspruch eines diagnostischen Werkzeugs für die *in vivo* Bildgebung, wie auch der Enzyminhibition *in vivo* genügt. In der Literatur hat sich hierfür der Begriff des Theranostic etabliert. Bei den verwendeten Antikörperformaten handelt es sich um einen sogenannten Nanobody (s+16a, 17 kDa), ein Nanobody-Fc-Fusionsprotein (s+16mFc, 82 kDa), sowie einen monoklonalen Antikörper (Nika102, 150 kDa). Nanobodies sind Fragmente von Schwere-Ketten-Antikörpern, welche zusätzlich zu konventionellen Antikörperklassen von Kameliden exprimiert werden.

Alle drei untersuchten Antikörperformate zeigten eine spezifische Bindung an ART2, aber nur die Schwere-Ketten-Antikörper basierten Konstrukte waren in der Lage, ART2 zu inhibieren. *In vivo* zeigte der Nanobody eine schnelle, aber kurz anhaltende Inhibition von ART2, während das Nanobody-Fc-Fusionsprotein eine anhaltende Inhibition aufwies. Der monoklonale Antikörper zeigte eine dem Nanobody-Fc-Fusionsprotein ähnelnde Kinetik, ohne Inhibition von ART2. In den bildgebenden Versuchen *in vivo* war mit allen Konstrukten eine Detektion der murinen Lymphozyten in ART2 TG Mäusen innerhalb der axillären und inguinalen Lymphknoten möglich. Hierbei zeigten sich den vorherigen Versuchen entsprechende Kinetiken. Diese Ergebnisse konnten nach anschließender Präparation der Organe und Bestimmung der jeweiligen Signalstärken bestätigt werden.

Am Beispiel der ART2 zeigt diese Arbeit, dass die NIRF Bildgebung und zeitgleiche Modifikation einer Enzymaktivität im Sinne eines Theranostic mittels Nanobodies möglich ist.

Abstract

ADP-Ribosyltransferase 2 (ART2) is a toxin-related ecto-enzyme, which is expressed on murine T cells. It is able to ADP-ribosylate proteins by utilizing its substrate nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). Effects of ADP-Ribosylation include shedding of cell-surface proteins and the NAD induced cell death (NICD). To better investigate these effects, ART2 knockout (ART2 KO) and ART2 overexpressing, transgenic (ART2 TG) mice were generated by our group.

In this work, the pharmacokinetics, biodistribution and imaging properties of three ART2 targeting antibody-constructs were compared and their imaging capabilities were determined, using near-infrared-fluorescence-imaging (NIRF). The objective of these experiments was to determine, which of the applied constructs is best suited for simultaneous enzyme inhibition and NIRF imaging *in vivo*. The established term for such a probe is theranostic.

The different types of ART2 specific antibody constructs used in the experiments are a nanobody (s+16a, 17 kDa), a nanobody-Fc-fusion-protein (s+16mFc, 82 kDa) and a monoclonal antibody (Nika102, 150 kDa).

Nanobodies are fragments of heavy-chain-antibodies which are expressed by Camelidae in addition to conventional antibodies. These fragments maintain the antibodies ability to bind their respective targets and are able to inhibit enzymes by blockade of their active centre.

All three antibody constructs bound specifically to ART2, whereas only the constructs based on heavy-chain-antibodies were able to inhibit ART2 activity. *In vivo* experiments showed a short lasting but potent inhibition of ART2 by the nanobody and a slowly increasing level of ART2 inhibition by the nanobody-Fc-fusion-protein after injection. The monoclonal antibody displayed similar kinetics as the nanobody-Fc-fusion-protein without inhibition of ART2. In NIRF imaging experiments *in vivo*, all antibody constructs enabled the detection of axillary and inguinal lymph nodes in ART2 TG mice. The determined kinetics were similar to those found by the previously performed experiments. The *in vivo* imaging results were confirmed by dissection and *ex vivo* imaging of single organs.

This work shows in a proof of principle study that NIRF imaging and simultaneous enzyme-inhibition is feasible. It indicates that single-domain nanobodies are best suited for short-term uses, whereas larger nanobody-Fc-fusion proteins are better suited for long-term uses.

1 Einleitung

1.1 ADP-Ribosyltransferase 2

Das in dieser Arbeit als Zielstruktur verwendete Enzym ADP-Ribosyltransferase 2 (ART2) ist ein auf murinen T Lymphozyten exprimiertes Ekto-Enzym (Koch-Nolte et al. 1996), das zur Gruppe der ADP-Ribosyltransferasen gehört und phylogenetisch mit bakteriellen Toxinen der Erreger von Diphterie, Pertussis, Cholera und dem Toxin von Clostridium Difficile verwandt ist (Hottiger et al. 2010). Diese Enzyme sind in der Lage, die ADP-Ribose-Gruppe von NAD unter Abspaltung von Nicotinamid auf Zielstrukturen zu übertragen. Hierzu zählen die Aminosäurereste von Lysin, Arginin, Glutamat, Aspartat, Cystein, Diphtamid, Phospho-Serin und Asparagin, sowie DNA, tRNA und Antibiotika (Jacobson und Jacobson 1989; Aktories 1992; Haag et al. 1997; Koch-Nolte et al. 2006; Hassa et al. 2006). Folgen der ADP-Ribosylierung sind Veränderungen in der Aktivität, der Adhäsionsfähigkeit, des Migrationsverhaltens und des Überlebens von Zellen. Unterteilt werden die ADP-Ribosyltransferasen nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit gegenüber den bakteriellen Toxinen von Corynebacterium Diphteriae (ARTD) oder dem Cholera Toxin (ARTC), sowie nach dem Modus der ADP-Ribosylierung in mono- (MART) oder poly-ADP-Ribosyltransferasen (PART). ART2 wird durch die strukturelle Ähnlichkeit zum Diphterietoxin nach aktuell geltender Nomenklatur auch als ARTC2 bezeichnet (Hottiger et al. 2010) und auf Grund seiner kristallografischen Struktur, die durch ihre zwei Domänen ein kieferähnliches Aussehen hat, häufig als Pacman dargestellt (Mueller-Dieckmann et al. 2002).

Es können zwei Isoformen der ART2, die ART2.1 und ART2.2 unterschieden werden, welche beide auf murinen T Lymphozyten exprimiert werden. Während ART2.1 durch eine Disulfidbrücke im Bereich des katalytischen Zentrums nur unter reduzierenden Bedingungen aktiviert wird, liegt ART2.2 in aktiver Form vor (Haag et al. 1997; Thiele et al. 1997; Hong et al. 2007).

Zu den bisher identifizierten Zielstrukturen der ART2 zählen der Purinrezeptor P2X7, das Integrin LFA-1, sowie weitere Oberflächenproteine von T Zellen (CD8, CD27, CD43, CD44, CD45) (Wang et al. 1996; Okamoto et al. 1998; Seman et al. 2003; Bannas et al. 2005; Koch-Nolte et al. 2006; Adriouch et al. 2008; Scheuplein et al. 2009; Hubert et al. 2010; Lischke et al. 2013).

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte werden durch die ADP-Ribosylierung von P2X7 ausgelöst. P2X7 ist ein Mitglied der P2X-Familie, einer Gruppe von ATP aktivierten Ionen Kanälen. Die Aktivierung des P2X7 Kanals, der auch auf T Lymphozyten exprimiert wird (Baricordi et al. 1996; Collo et al. 1997; Ferrari et al. 2000), führt über einen Anstieg des intrazellulären Calciums zu einer Verschiebung des Membranpotentials und nach Externalisierung von Phosphatidylserin und Porenbildung in der Zellmembran zum Zelltod (Seman et al. 2003). Hierbei kann statt der Bindung von ATP an P2X7 auch die ADP-Ribosylierung des Argininrests R125 zur Öffnung des Ionenkanals führen (Adriouch et al. 2008). Dieser Effekt wird als NAD induzierter Zelltod (NICD) bezeichnet und kann über die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin und die Aufnahme von Propidiomjodid nachgewiesen werden (Scheuplein et al. 2009).

Durch die Freisetzung von NAD und ATP im Rahmen von Entzündung und Gewebeschäden (Haag et al. 2007) können *in vivo* insbesondere hoch ART2 exprimierende T Zellen eliminiert werden (Adriouch et al. 2007; Hubert et al. 2010). Im Menschen liegt das Gen der ART2 auf Grund mehrerer Stopcodons nur als Pseudogen vor (Haag et al. 1994).

In dieser Arbeit stellte ART2 ein Modellantigen für die Untersuchung verschiedener Antikörperformate für die NIRF Bildgebung und Immunmodulation *in vivo* dar.

1.2 Schwere-Ketten-Antikörper

In dieser Arbeit wurden verschiedene Antikörperformate zur Identifizierung und Inhibition von ART2 verwendet. Neben einem monoklonalen, aus der Ratte stammenden konventionellen IgG2a Antikörper (Nika102), waren dies die variable Domäne eines aus dem Llama stammenden Schwere-Ketten-Antikörpers, auch Nanobody genannt (s+16a), sowie ein Fusionsprotein aus Nanobody und murinem IgG1 (s+16mFc) (Koch-Nolte et al. 1999; Koch-Nolte et al. 2007; Scheuplein et al. 2010).

Schwere-Ketten-Antikörper werden von Kameliden zusätzlich zu konventionellen Antikörpern exprimiert und als IgH bezeichnet. Diese Antikörper besitzen statt der vier Ketten konventioneller Antikörper nur zwei, es fehlen ihnen die leichten Ketten, weiterhin fehlen ihnen die CH1 Domäne der schweren Ketten. Trotz dieses scheinbaren Mangels sind Schwere-Ketten-Antikörper voll funktionsfähig(Hamers-Casterman et al. 1993; Greenberg et al. 1995; Barelle et al. 2009).

Konventionelle Antikörper binden ihr Antigen über die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten. Diese Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist meist planar und schwer erreichbare Strukturen, wie beispielsweise katalytische Zentren von Enzymen sind nicht als Epitope zugänglich (Wesolowski et al. 2009). Schwere-Ketten-Antikörper umgehen diese Einschränkung, da sie zum einen nur mit einer statt zwei variablen Domänen an ihre Zielstruktur binden, zum anderen ist insbesondere ihre Complementarity Determining Region 3 (CDR 3) länger als die konventioneller Antikörper. Hierdurch können sich schlaufenartige Formationen bilden, die in der Lage sind, in für konventionelle Antikörper schwer zugängliche Areale hineinzureichen (Wu et al. 1993; Genst et al. 2006).

Um Schwere-Ketten-Antikörper und damit Nanobodies gegen ein gewähltes Antigen zu generieren, ist es möglich, ein Mitglied der Kameliden wie beispielsweise ein Lama mit dem entsprechenden Antigen zu immunisieren. Anschließend werden nach Entnahme von Plasmazellen die für Schwere-Ketten-Antikörper kodierenden Sequenzen PCR-amplifiziert und in eine Phagen-Display Bibliothek kloniert. Die gegen das eingesetzte Antigen gerichteten Antikörper werden aus dieser Phagenbibliothek durch Bindung an das Antigen exprimierende Zellen selektioniert. Letztlich kann die variable Domäne des gewählten Antikörpers rekombinant als sogenannter Nanobody produziert werden (Harmsen und Haard 2007). Diese Nanobodies sind auch als Fragment des ursprünglichen Antikörpers in der Lage, spezifisch und hochaffin an ihr jeweiliges Epitop zu binden. Durch ihre geringe Größe von etwa 15 kDa gegenüber den 150 kDa konventioneller Antikörper unterscheiden sich Nanobodies nicht nur in ihren Bindungseigenschaften, sie können weiterhin schneller Gewebe penetrieren, weisen eine geringere Immunogenität als konventionelle Antikörper auf und sind thermisch stabil (Groeve et al. 2010).

Da Nanobodies auf Grund ihrer geringen Größe von etwa 5 nm renal eliminiert werden und damit nur eine kurze Halbwertszeit besitzen, gibt es Ansätze, diese Eigenschaft durch Bildung multivalenter Konstrukte und Fusion an andere Proteine zu verändern (Iqbal et al. 2010; Roovers et al. 2011). Zudem können Nanobodies keine Fc-Rezeptor Funktionen vermitteln. Es wurde ein Fusionsprotein aus s+16a und einem murinen IgG1 Schwanz generiert, welcher eine besonders hohe Affinität gegenüber dem FcRn-Rezeptor aufweist (Ghetie et al. 1997). Hierdurch konnte eine gegenüber dem Nanobody deutlich verlängerte Halbwertszeit im Serum gewährleistet werden (Scheuplein et al. 2010).

In dieser Arbeit wurden die Pharmakokinetik und das Maß der ART2 Inhibition eines Nanobodies (s+16a), eines Nanobody-Fc-Fusionsproteins (s+16mFc) und eines monoklonalen Antikörpers (Nika102) *in vivo*, sowie ihr Potential, als Hilfsmittel in der *in vivo* NIRF Bildgebung eingesetzt zu werden, untersucht.

1.3 Nah-Infrarot-Fluoreszenzoptische Bildgebung (NIRF)

Bildgebende Verfahren sind heutzutage in klinischen, wie auch präklinischen Anwendungen von zunehmender Bedeutung. Insbesondere die molekulare Bildgebung, welche es sich zum Ziel gesetzt hat, biologische und zelluläre Prozesse *in vivo* abzubilden, ist ein Bereich stetig wachsenden Interesses (Weissleder und Mahmood 2001; Massoud und Gambhir 2003). Ein Vorteil vieler bildgebender Verfahren gegenüber anderen Untersuchungsmethoden ist hierbei die Möglichkeit, kontinuierliche, nicht invasive Analysen eines einzelnen Organismus durchzuführen. Hierbei stellt die NIRF Bildgebung eine vor allem in präklinischen Anwendungen genutzte Modalität dar, da sie mit verhältnismäßig geringen Kosten, geringem apparativem Aufwand und ohne den Einsatz ionisierender Strahlung in der Lage ist, biologische Prozesse abzubilden (Taruttis und Ntziachristos 2012). Weiterhin weist sie eine höhere Sensitivität als die Computertomografie oder Magnetresonanztomografie auf (Graves et al. 2003; Hoffman und Gambhir 2007).

In der NIRF Bildgebung wird ein Lichtimpuls einer definierten Wellenlänge ausgesendet, um Fluorochrome in beobachtetem Gewebe zur Emmission von Licht einer für das jeweilige Fluorochrom spezifischen Wellenlänge anzuregen. Die eingesetzten Wellenlängen von 650nm – 1000nm sind hierbei vorteilhaft, da sie tiefer in Gewebe penetrieren können als kurzwelligeres Licht. Zudem ist die Stärke der Autofluoreszenz von Gewebe bei diesen Wellenlängen gering und die Rate absorbierten Lichts durch Wasser und Hämoglobin bei diesen Wellenlängen ist minimal (Muller et al. 2001; Weissleder und Ntziachristos 2003). Die generierten Signale werden anschließend von einem Charged Coupled Device (CCD) Sensor detektiert. Dieses Signal kann mit einer zuvor erstellten Fotografie überlagert werden und ermöglicht eine örtliche Zuordnung des detektierten Fluoreszenzsignals. Durch zusätzlichen Einsatz von Filtern geringer Bandbreite kann die Detektion interferierender Signale minimiert werden. Grundsätzlich können bei der NIRF Bildgebung zwei Verfahren nach Position der eingesetzten Lichtquelle unterschieden werden. Zum einen ist dies die Epi-Illumination, bei der Lichtquelle und Sensor auf derselben

Seite der beobachteten Struktur liegen und zum anderen die Trans-Illumination, bei der sich Lichtquelle und Sensor auf gegenüberliegenden Seiten des beobachteten Objekts befinden.

In dieser Arbeit wurde die Technik der Epi-Illumination eingesetzt, um *in vivo* und *ex vivo* an ART2 gebundene Antikörper zu detektieren. Das hierzu eingesetzte Fluorochrom ist AlexaFluor680, welches bei einer Wellenlänge von 679nm angeregt wird und Licht einer Wellenlänge von 702nm emittiert. Dies erlaubte die Durchführung vergleichender Untersuchungen der eingesetzten Antikörper in der NIRF Bildgebung und der Durchflusszytometrie.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, drei Antikörperkonstrukte, welche gegen das auf T Zellen exprimierte Ekto-Enzym ART2 gerichtet sind, vergleichend zu untersuchen.
Bei den Konstrukten handelt es sich um den Nanobody s+16a (17 kDa), das Nanobody-Fc-Fusionsprotein s+16mFc (82 kDa) und den monoklonalen Antikörper Nika102 (150 kDa).

Es sollte festgestellt werden, wie effizient ART2 *in vitro* und *in vivo* detektiert werden kann und in welchem Maße sich die Aktivität der ART2 inhibieren lässt. Diese kann durch den Einsatz von etheno-NAD bestimmt werden.
Weiterhin sollte die Pharmakokinetik der eingesetzten Antikörper untersucht werden, um das zeitliche Ausmaß der Bindung an und Inhibition von ART2 zu untersuchen.

Durch Versuche in der NIRF Bildgebung sollte festgestellt werden, ob es möglich ist, durch die mit Fluorochromen konjugierten Antikörper murine Lymphknoten *in vivo* darzustellen und welches der hierfür eingesetzten Konstrukte am besten geeignet sei.
Vor Durchführung der NIRF Bildgebung sollten die Dosen an Antikörpern bestimmt werden, welche eine bestmögliche Bindung an ART2 bei möglichst geringer Menge frei zirkulierender Antikörper gestatten. Hierzu sollten Untersuchungen von Seren und Urin nach Injektion der Antikörper in ART2 TG, ART2 KO und Balb/c WT Mäuse durchgeführt werden.

Durch die zeitgleiche Inhibition der ART2 während der bildgebenden Untersuchungen sollte schließlich geklärt werden, ob eines der eingesetzten Konstrukte dem Anspruch eines Theranostics genügt.

3 Ergebnisse

3.1 Fluorochrom konjugierte Antikörperformate in der Nah-Infrarot-Fluoreszenzoptischen Bildgebung von murinen Lymphozyten

In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies.
Bannas P*, Well L*, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Hochgräfe K, Trepel M, Adam G, Ittrich H, Koch-Nolte F.
Contrast Media Mol Imaging. 2014 Mar-Apr;9(2):135-42.
** The first two authors contributed equally.*

Ergebnisse

3.1.1 *In vitro* Bindung und Inhibition von ART2 durch verschiedene Antikörperformate

Die Inkubation präparierter Lymphozyten aus Balb/c WT, ART2 TG und ART2 KO Mäusen mit s+16a, s+16mFc und Nika102 ermöglichte die Detektion von ART2 mit allen Antikörperkonstrukten bei Balb/c WT und ART2 TG Mäusen. Hierbei zeigte sich das aus vorherigen Versuchen bekannte Expressionsmuster. Die Stärke der Anfärbung von ART2 war mit dem Nanobody s+16a etwas schwächer als mit den anderen beiden Konstrukten. Die enzymatische Aktivität von ART2 ließ sich durch s+16a und s+16mFc fast vollständig inhibieren, während der monoklonale Antikörper Nika102 nur eine geringe Modulation der ART2 Aktivität aufwies.

3.1.2 *In vivo* Bindung und Inhibition von ART2

Nach intravenöser Injektion von s+16a, s+16mFc und Nika102 in Balb/c WT Mäuse erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten die Präparation der Lymphknoten zur Bestimmung der Bindung an und Inhibition von ART2 mittels Durchflusszytometrie. Hierbei zeigte sich eine Anfärbung von Lymphozyten mit s+16a und s+16mFc 10 Minuten nach Injektion, während die Anfärbung durch den größeren Antikörper Nika102 erst nach zwei Stunden ein Maximum erreichte. Die Detektion von ART2 war im Fall von s+16mFc und Nika102 über zwölf Stunden möglich, im Falle von

s+16a war bereits nach zwei Stunden ein Rückgang der Anfärbung zu beobachten. Die enzymatische Aktivität von ART2 konnte mit s+16a und s+16mFc innerhalb der ersten zwei Stunden nach Injektion submaximal gehemmt werden und hielt bei s+16mFc für zwölf Stunden an. Im Falle von s+16a sank die Hemmung im Laufe von zwölf Stunden bis auf Ausgangswerte ab. Nika102 war nicht in der Lage, ART2 zu inhibieren.

3.1.3 Serum und Urin Analysen

Die zur Bestimmung der bestmöglichen Antikörperdosis durchgeführten Versuche zeigten, dass in den Seren von ART2 TG und auch ART2 KO Mäusen zwei Stunden nach Injektion von 50µg Antikörpern große Mengen freier s+16mFc und Nika102 zirkulierten, während keine freien s+16a gefunden wurden. In der Untersuchung des Urins zeigten sich große Mengen an s+16a, aber weder s+16mFc noch Nika102. Bei Injektion niedrigerer Dosen zeigten sich nur in ART2 KO und nicht in ART2 TG Mäusen frei zirkulierende s+16mFc und Nika102.

3.1.4 *In vivo* Bildgebung der ART2 auf T Zellen axillärer und zervikaler Lymphknoten

Für die *in vivo* Bildgebung wurden unterschiedliche Dosen von s+16a (50µg), s+16mFc (5µg) und Nika102 (10µg) in ART2 TG und ART2 KO Mäuse intravenös injiziert. Die Dosen wurden anhand der oben vorgestellten Versuche so gewählt, dass die Menge an frei zirkulierenden Antikörpern möglichst gering war, um deren störende Signale zu minimieren. Nach Injektion ließen sich in ART2 TG Mäusen mit allen drei Konstrukten Signale in axillären und zervikalen Lymphknoten detektieren. Hierbei wiesen mit s+16a injizierte Tiere keine unspezifischen Signale auf, die frei zirkulierenden Antikörpern zugerechnet werden konnten, während störende Hintergrundsignale in mit s+16mFc und Nika102 injizierten Mäusen festzustellen waren. Die deutlichsten Lymphknotensignale waren mit s+16a bereits zwei Stunden und mit Nika102 erst 24 Stunden nach Injektion zu detektieren. Mit s+16mFc injizierte Mäuse zeigten ebenfalls Lymphknotensignale, diese waren aber nur geringfügig stärker als das Hintergrundsignal. 24 Stunden nach Injektion zeigten die mit s+16mFc und Nika102 injizierten ART2 TG Mäuse eine deutliche Abnahme diffuser Signale, während diese in ART2 KO Mäusen persistierten und in keiner der mit s+16a injizierten Mäuse auftraten.

Die quantitative Analyse der detektierten Signale ergab eine Anfärbung von Lymphknoten mit s+16a über 24 Stunden, mit einem Maximum eine Stunde nach Injektion. Signale in ART2 KO Mäusen nahmen schnell ab, während in ART2 TG Mäusen über 24 Stunden eine hohe Signal zu

Hintergrund Ratio herrschte. Im Gegensatz hierzu erreichten die mit s+16mFc und Nika102 erzeugten Signale erst nach zwei bis vier Stunden ihr Maximum, blieben aber über 24 Stunden nahezu konstant. Es zeigte sich eine insgesamt geringere Signalstärke der mit s+16mFc und Nika102 injizierten Mäuse gegenüber den mit s+16a injizierten. Dieser Unterschied entsprach den jeweiligen Unterschieden der gewählten Antikörperdosis. Die Unterscheidung zwischen ART2 TG und ART2 KO Lymphknoten war bei allen Konstrukten zu jedem Zeitpunkt möglich, allerdings war die Differenz der Signalstärken zwischen ART2 TG und ART2 KO Mäusen nach Injektion von s+16a über den gesamten beobachteten Zeitraum größer als bei den anderen injizierten Konstrukten.

3.1.5 *Ex vivo* Analysen lymphatischer Organe

Um zu bestimmen, ob und in welchem Maße die zum Teil detektierten diffusen Signale nach Injektion von s+16mFc und Nika102 durch frei zirkulierende Antikörper ausgelöst wurden, erfolgte eine Untersuchung von Seren und Urin. In den Seren der zuvor mit s+16a injizierten Mäuse fanden sich weder zwei Stunden, noch 24 Stunden nach Injektion frei zirkulierende s+16a, während zwei Stunden nach Injektion sowohl in ART2 TG als auch in ART2 KO Mäusen frei zirkulierende s+16mFc und Nika102 nachgewiesen werden konnten. Hierbei war die Menge an Antikörpern in ART2 KO Mäusen höher als in ART2 TG Mäusen. 24 Stunden nach Injektion ließen sich im Serum der ART2 TG Mäuse keine frei zirkulierenden s+16mFc oder Nika102 detektieren, während in ART2 KO Mäusen noch geringe Mengen Antikörper nachweisbar waren.
Im Urin fanden sich zwei Stunden, aber nicht 24 Stunden nach Injektion, sowohl in ART2 TG als auch in ART2 KO Mäusen, s+16a. S+16mFc und Nika102 waren im Urin weder nach zwei, noch nach 24 Stunden nachweisbar.
Zur Überprüfung der *in vivo* detektierten Signale folgte eine *ex vivo* Bildgebung der präparierten Organe mit anschließender statistischer Auswertung. Hierbei zeigten alle Lymphknoten von ART2 TG Mäusen unabhängig vom injizierten Konstrukt eine deutliche Anfärbung, während die Lymphknoten der ART2 KO Mäuse keine Anfärbung zeigten und in ihrer Signalstärke den Kontrollen entsprachen. Die quantitativen Analysen zeigten bei allen Konstrukten einen signifikanten Unterschied in der Signalstärke zwischen ART2 TG und ART2 KO Mäusen zwei Stunden nach Injektion, während 24 Stunden nach Injektion nur noch die mit s+16a und Nika102 injizierten Mäuse signifikante Unterschiede in der Signalstärke aufwiesen. Die Milzen wiesen

Signale auf, welche denen der Lymphknoten entsprachen. Die höchste überhaupt gemessene Signalstärke war in den Nieren zu detektieren, zwei Stunden nach Injektion mit s+16a.

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass eine Antikörper basierte Bildgebung mit zeitgleicher Inhibition des detektierten Enzyms durchführbar ist. Mit allen drei verwendeten Antikörperformaten war es möglich, Lymphknoten in der NIRF Bildgebung darzustellen. Hierbei konnte mit den Nanobody-basierten Konstrukten s+16a und s+16mFc eine simultane Inhibition der ART2 *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Durch den Einsatz des Fluorochroms AlexaFluor680 war es möglich, die verwendeten Antikörper nicht nur in der Bildgebung, sondern auch zur Validation vergleichend in der Durchflusszytometrie zu untersuchen.

Bei der antikörperbasierten Bildgebung ist zu berücksichtigen, dass die ausgewählten Zielstrukturen *in vivo* schwerer zu erreichen sind als *in vitro*, da die eingesetzten Antikörper verschiedene Barrieren überwinden müssen. Weiterhin können ungebundene Antikörper im Gewebe verbleiben und so zu unspezifischen Hintergrundsignalen führen, während *in vitro* überschüssiges Material durch Waschen entfernt werden kann. Eine gute Gewebepenetration, sowie eine spezifische, hochaffine Bindung an die Zielstruktur und eine schnelle renale oder biliäre Exkretion sind somit erstrebenswerte Eigenschaften (Choi et al. 2010; Choi et al. 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, welchen Einfluss das Format des genutzten Antikörpers auf Gewebepenetration und spezifische Bindung einerseits und Elimination überschüssiger Antikörper andererseits hat. Hierbei erlaubte die renale Elimination von s+16a den Einsatz hoher Dosen *in vivo*, während im Falle von s+16mFc und Nika102 die längere Halbwertszeit nur den Einsatz geringerer Dosen erlaubte, welche durch vorherige Untersuchungen von Seren und Urin bestimmt wurden. So war auch mit den größeren Konstrukten s+16mFc und Nika102 eine Darstellung der Lymphknoten mit geringem Hintergrundsignal durch ungebundene Antikörper möglich. Bei der quantitativen Analyse präparierter Organe zeigte sich auf Grund der renalen Elimination eine starke Retention von s+16a in den Nieren. Ein Umstand, der auch in anderen Studien gezeigt werden konnte (Tchouate Gainkam et al. 2011), eine mögliche Schädigung des Nierenparenchyms wäre zu überprüfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass konventionelle Antikörper auf Grund ihrer hohen Spezifität und Affinität gegenüber dem Zielgewebe prinzipiell für die Anwendung in bildgebenden Verfahren geeignet sind, doch können sie nicht alle der oben genannten Kriterien

eines optimalen spezifischen Werkzeugs erfüllen. So sind sie auf Grund ihrer Größe nur eingeschränkt in der Lage, Gewebe zu penetrieren und da sie nicht renal eliminiert werden, ist auch ihre Halbwertszeit in diesem Zusammenhang als problematisch zu beurteilen (Lisy et al. 2008). Für Nanobodies gelten diese Einschränkungen nicht, so dass sie besser für die Bildgebung geeignet sind (Groeve et al. 2010; Vosjan et al. 2011; Vosjan et al. 2012). Durch ihre stäker ausgeprägte Fähigkeit der Enzyminhibition sind sie zudem auch unter therapeutischen Aspekten interessant und erfüllen damit die Anforderungen eines Theranostic. Es gilt allerdings zu berücksichtigen, dass für optimale bildgebende Bedingungen die Anzahl frei zirkulierender Antikörper möglichst gering sein muss, während für eine wirksame und anhaltende Therapie ein Überschuss an Antikörpern notwendig ist, um frei werdende Bindungsstellen besetzen zu können. Hierbei sind wiederum Nanobodies auf Grund ihrer schnellen Elimination im Nachteil, so dass diese eher für zeitlich begrenzte Applikationen von Bedeutung sein könnten, während konventionelle Antikörper oder andere größere Konstrukte für langanhaltende Therapien geeignet sind. Wenn Therapie und Bildgebung also zeitgleich durchgeführt werden sollten, scheint es hierbei unumgänglich zu sein, einen Kompromiss zwischen beiden gewünschten Eigenschaften zu finden. Die Schaffung weiterer Konstrukte, wie beispielsweise von Multimeren, bispezifischen Dimeren oder die Fusion von Nanobodies an andere Proteine wären hierbei eine denkbare Möglichkeit, dieses Problem zu adressieren (Scheuplein et al. 2009; Iqbal et al. 2010; Roovers et al. 2007; Roovers et al. 2011).

Eine standortbedingte Limitation dieses Projektes war trotz verschiedener Vorteile der NIRF Bildgebung, wie hoher Sensitivität, leichter Durchführbarkeit, geringen Kosten, langer Lagerungsfähigkeit der eingesetzten Proben und das Fehlen radioaktiver Strahlung die Wahl der bildgebenden Modalität (Hamada et al. 2011; Weissleder und Ntziachristos 2003). Durch die geringe Eindringtiefe von 7-8 mm auf Grund von Absorption und Streuung im Gewebe und der fehlenden Möglichkeit einer dreidimensionalen Rekonstruktion ist die Aussagekraft der NIRF Bildgebung eingeschränkt. Weiterhin kann es durch das zweidimensionale Verfahren zu Falschaussagen kommen, da das von Fluorochromen emittierte Licht zwar proportional zur Menge der eingesetzten Fluorochrome ist, die Stärke des gemessenen Signals aber nicht entsprechend der Tiefe der Probe im Gewebe korrigiert werden kann. Weiterhin können falsch hohe Signale durch Überlagerungen nicht identifiziert werden. Diesem Problem könnte in weiteren Studien mit einer Weiterentwicklung dieses Verfahrens, wie beispielsweise der Nah-

Infrarot-Tomographie (Ntziachristos 2006; Weissleder und Ntziachristos 2003) oder anderen Verfahren wie der ebenfalls nicht radioaktiven Opto-Akustischen-Bildgebung (Ntziachristos und Razansky 2013; Razansky et al. 2011; Razansky et al. 2012) oder radioaktiven Verfahren wie dem PET-CT oder SPECT, begegnet werden. In dieser Arbeit sollten durch Präparation und Untersuchung einzelner Organe, sowie vergleichende Untersuchungen in der Durchflusszytometrie die genannten Limitationen der NIRF Bildgebung minimiert werden.
In klinischen Applikationen werden Nanobodies bereits zur Diagnostik und Therapie eingesetzt (Harlaar et al. 2013; Ulrichts et al. 2011), ein klinisches Modell, das dem Anspruch des Theranostic in jeder Hinsicht genügt, ist bisher aber noch nicht etabliert worden.

Mit der Verwendung von ART2 als Antigen konnte im Sinne einer Machbarkeitsstudie gezeigt werden, dass die NIRF Bildgebung von Lymphozyten mit simultaner Inhibition eines Enzyms der Zelloberfläche durchführbar ist. Hierbei zeigte insbesondere der verwendete Nanobody s+16a ein hohes Potential für die zukünftige Einsetzbarkeit als Theranostic, am ehesten im Bereich zeitlich begrenzter Anwendungen. Größere Konstrukte scheinen dagegen besser für langzeitige Anwendungen geeignet zu sein. Es bleibt zu klären, welche der möglichen Antikörperformate hier jeweils den meisten Nutzen erbringen werden.

Erklärung über Art und Umfang der Mitwirkung des Promovenden bei der Bearbeitung des Forschungsthemas und bei der Erstellung der Publikation

Beitrag im Einzelnen:

Die in Abb. 1a und Abb. 1b gezeigten schematischen Darstellungen wurden von Dr. med. Bannas erstellt, das in Abb. 1c gezeigte Gel wurde von Frau Schmid angefertigt, der Promovend führte die anschließenden bildgebenden Versuche durch.

Die in Abb. 2 und Abb. 3 dargestellten Versuche wurden vom Promovenden durchgeführt.

Bei den in Abb. 4 und Abb. 5 gezeigten Versuchen beteiligten sich Frau Schmid und Herr Lenz an der Depilation der Mäuse vor den bildgebenden Untersuchungen, am Handling der Tiere während der Versuche, sowie an der Präparation und Aufbereitung einzelner Organe unter Leitung des Promovenden, der auch die i.v. Injektionen durchführte.

In Versuchen bezüglich der Konzentration von Antikörpern in Serum und Urin wurde der Promovend durch Dr. rer. nat. Rissiek bei i.v. und i.p. Injektionen, sowie bei der Präparation der Mäuse unterstützt.

Die Planung des Ablaufs der einzelnen Versuche, sowie deren Auswertung, erfolgte durch den Promovenden in Absprache mit Dr. med. Bannas und Prof. Dr. med. Koch-Nolte.

Außer Abb. 1a und Abb. 1b wurden alle Abbildungen vom Promovenden erstellt.

Der Promovend beteiligte sich an Konzept und Design der Studie, welche von Prof. Dr. med. Koch-Nolte und Dr. med. Bannas erdacht wurde, sowie an der Überarbeitung des veröffentlichen Manuskripts.

Die Konjugation aller verwendeten Antikörper an AlexaFluor680 wurde von Frau Schmid durchgeführt.

Prof. Dr. med. Trepel und Dr. Hochgräfe stellten die für die NIRF Bildgebung benötigten Geräte und Expertise zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

Adriouch, Sahil; Bannas, Peter; Schwarz, Nicole; Fliegert, Ralf; Guse, Andreas H.; Seman, Michel et al. (2008): ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. In: *FASEB J.* 22 (3), S. 861–869. DOI: 10.1096/fj.07-9294com.

Adriouch, Sahil; Hubert, Sandra; Pechberty, Severine; Koch-Nolte, Friedrich; Haag, Friedrich; Seman, Michel (2007): NAD+ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. In: *J. Immunol.* 179 (1), S. 186–194.

Aktories, Klaus (Hg.) (1992): ADP-Ribosylating Toxins: Springer Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology).

Bannas, Peter; Adriouch, Sahil; Kahl, Sarah; Braasch, Fenja; Haag, Friedrich; Koch-Nolte, Friedrich (2005): Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. In: *Blood* 105 (9), S. 3663–3670. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3325.

Barelle, Caroline; Gill, Davinder S.; Charlton, Keith (2009): Shark novel antigen receptors--the next generation of biologic therapeutics? In: *Adv Exp Med Biol* 655, S. 49–62. DOI: 10.1007/978-1-4419-1132-2_6.

Baricordi, O. R.; Ferrari, D.; Melchiorri, L.; Chiozzi, P.; Hanau, S.; Chiari, E. et al. (1996): An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. In: *Blood* 87 (2), S. 682–690.

Choi, Hak Soo; Liu, Wenhao; Liu, Fangbing; Nasr, Khaled; Misra, Preeti; Bawendi, Moungi G.; Frangioni, John V. (2010): Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. In: *Nat Nanotechnol* 5 (1), S. 42–47. DOI: 10.1038/nnano.2009.314.

Choi, Hak Soo; Liu, Wenhao; Misra, Preeti; Tanaka, Eiichi; Zimmer, John P.; Itty Ipe, Binil et al. (2007): Renal clearance of quantum dots. In: *Nat Biotechnol* 25 (10), S. 1165–1170. DOI: 10.1038/nbt1340.

Collo, G.; Neidhart, S.; Kawashima, E.; Kosco-Vilbois, M.; North, R. A.; Buell, G. (1997): Tissue distribution of the P2X7 receptor. In: *Neuropharmacology* 36 (9), S. 1277–1283.

Ferrari, D.; La Sala, A.; Chiozzi, P.; Morelli, A.; Falzoni, S.; Girolomoni, G. et al. (2000): The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. In: *FASEB J* 14 (15), S. 2466–2476. DOI: 10.1096/fj.00-0031com.

Genst, Erwin de; Silence, Karen; Decanniere, Klaas; Conrath, Katja; Loris, Remy; Kinne, Jorg et al. (2006): Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (12), S. 4586–4591. DOI: 10.1073/pnas.0505379103.

Ghetie, V.; Popov, S.; Borvak, J.; Radu, C.; Matesoi, D.; Medesan, C. et al. (1997): Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. In: *Nat Biotechnol* 15 (7), S. 637–640. DOI: 10.1038/nbt0797-637.

Graves, Edward E.; Ripoll, Jorge; Weissleder, Ralph; Ntziachristos, Vasilis (2003): A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging. In: *Med Phys* 30 (5), S. 901–911.

Greenberg, A. S.; Avila, D.; Hughes, M.; Hughes, A.; McKinney, E. C.; Flajnik, M. F. (1995): A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. In: *Nature* 374 (6518), S. 168–173. DOI: 10.1038/374168a0.

Groeve, K. de; Deschacht, N.; Koninck, C. de; Caveliers, V.; Lahoutte, T.; Devoogdt, N. et al. (2010): Nanobodies as Tools for In Vivo Imaging of Specific Immune Cell Types. In: *Journal of Nuclear Medicine* 51 (5), S. 782–789. DOI: 10.2967/jnumed.109.070078.

Haag, F.; Koch-Nolte, F.; Gerber, A.; Schroder, J.; Thiele, H. G. (1997): Rat T cell differentiation alloantigens RT6.1 and RT6.2 are NAD(+)-metabolizing ecto-enzymes that differ in their enzymatic activities. In: *Transplant Proc* 29 (3), S. 1699–1700.

Haag, F.; Koch-Nolte, F.; Kuhl, M.; Lorenzen, S.; Thiele, H. G. (1994): Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. In: *J Mol Biol* 243 (3), S. 537–546. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1680.

Haag, Friedrich; Adriouch, Sahil; Braß, Anette; Jung, Caroline; Möller, Sina; Scheuplein, Felix et al. (2007): Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. In: *Purinergic Signal.* 3 (1-2), S. 71–81. DOI: 10.1007/s11302-006-9038-7.

Hamada, Yoh; Gonda, Kohsuke; Takeda, Motohiro; Sato, Akira; Watanabe, Mika; Yambe, Tomoyuki et al. (2011): In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. In: *Blood* 118 (13), S. e93-e100. DOI: 10.1182/blood-2010-12-322842.

Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E. B. et al. (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. In: *Nature* 363 (6428), S. 446–448. DOI: 10.1038/363446a0.

Harlaar, N.J; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; Bart, J.; Themelis, G.; van Dam, G.M; Ntziachristos, V. (2013): Real-time near infrared fluorescence (NIRF) intra-operative imaging in ovarian cancer using an αvβ3-integrin targeted agent. In: *Gynecologic Oncology* 128 (3), S. 590–595. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.12.011.

Harmsen, M. M.; Haard, H. J. de (2007): Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (1), S. 13–22. DOI: 10.1007/s00253-007-1142-2.

Hassa, Paul O.; Haenni, Sandra S.; Elser, Michael; Hottiger, Michael O. (2006): Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? In: *Microbiol Mol Biol Rev* 70 (3), S. 789–829. DOI: 10.1128/MMBR.00040-05.

Hoffman, John M.; Gambhir, Sanjiv S. (2007): Molecular imaging: the vision and opportunity for radiology in the future. In: *Radiology* 244 (1), S. 39–47. DOI: 10.1148/radiol.2441060773.

Hong, Shiyuan; Brass, Anette; Seman, Michel; Haag, Friedrich; Koch-Nolte, Friedrich; Dubyak, George R. (2007): Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. In: *J Immunol* 179 (9), S. 6215–6227.

Hottiger, Michael O.; Hassa, Paul O.; Luscher, Bernhard; Schuler, Herwig; Koch-Nolte, Friedrich (2010): Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. In: *Trends Biochem Sci* 35 (4), S. 208–219. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.12.003.

Hubert, Sandra; Rissiek, Björn; Klages, Katjana; Huehn, Jochen; Sparwasser, Tim; Haag, Friedrich et al. (2010): Extracellular NAD+ shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. In: *J. Exp. Med.* 207 (12), S. 2561–2568. DOI: 10.1084/jem.20091154.

Iqbal, U.; Trojahn, U.; Albaghdadi, H.; Zhang, J.; O'Connor-McCourt, M.; Stanimirovic, D. et al. (2010): Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours. In: *Br. J. Pharmacol.* 160 (4), S. 1016–1028. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00742.x.

Jacobson, Myron K.; Jacobson, Elaine L. (1989): ADP-ribose transfer reactions: mechanisms and biological significance: Springer-Verlag New York.

Koch-Nolte, F.; Duffy, T.; Nissen, M.; Kahl, S.; Killeen, N.; Ablamunits, V. et al. (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. In: *J. Immunol.* 163 (11), S. 6014–6022.

Koch-Nolte, F.; Petersen, D.; Balasubramanian, S.; Haag, F.; Kahlke, D.; Willer, T. et al. (1996): Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. In: *J Biol Chem* 271 (13), S. 7686–7693.

Koch-Nolte, Friedrich; Adriouch, Sahil; Bannas, Peter; Krebs, Christian; Scheuplein, Felix; Seman, Michel; Haag, Friedrich (2006): ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. In: *Ann. Med.* 38 (3), S. 188–199. DOI: 10.1080/07853890600655499.

Koch-Nolte, Friedrich; Reyelt, Jan; Schössow, Britta; Schwarz, Nicole; Scheuplein, Felix; Rothenburg, Stefan et al. (2007): Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. In: *FASEB J.* 21 (13), S. 3490–3498. DOI: 10.1096/fj.07-8661com.

Lischke, Timo; Schumacher, Valéa; Wesolowski, Janusz; Hurwitz, Robert; Haag, Friedrich; Koch-Nolte, Friedrich; Mittrücker, Hans-Willi (2013): CD8-β ADP-ribosylation affects CD8 + T-cell function. In: *Eur. J. Immunol.* 43 (7), S. 1828–1838. DOI: 10.1002/eji.201243231.

Lisy, Marcus-René; Goermar, Annika; Thomas, Claudia; Pauli, Jutta; Resch-Genger, Ute; Kaiser, Werner A.; Hilger, Ingrid (2008): In vivo near-infrared fluorescence imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in mice. In: *Radiology* 247 (3), S. 779–787. DOI: 10.1148/radiol.2472070123.

Massoud, Tarik F.; Gambhir, Sanjiv S. (2003): Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. In: *Genes Dev* 17 (5), S. 545–580. DOI: 10.1101/gad.1047403.

Mueller-Dieckmann, Christoph; Scheuermann, Till; Wursthorn, Karsten; Schroder, Jens; Haag, Friedrich; Schulz, Georg E.; Koch-Nolte, Friedrich (2002): Expression, purification,

crystallization and preliminary X-ray analysis of rat ecto-ADP-ribosyltransferase 2 (ART2.2). In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58 (Pt 7), S. 1211–1213.

Muller, M. G.; Georgakoudi, I.; Zhang, Q.; Wu, J.; Feld, M. S. (2001): Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. In: *Appl Opt* 40 (25), S. 4633–4646.

Ntziachristos, Vasilis (2006): Fluorescence molecular imaging. In: *Annu Rev Biomed Eng* 8, S. 1–33. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095831.

Ntziachristos, Vasilis; Razansky, Daniel (2013): Optical and opto-acoustic imaging. In: *Recent Results Cancer Res* 187, S. 133–150. DOI: 10.1007/978-3-642-10853-2_4.

Okamoto, S.; Azhipa, O.; Yu, Y.; Russo, E.; Dennert, G. (1998): Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. In: *J. Immunol.* 160 (9), S. 4190–4198.

Razansky, Daniel; Buehler, Andreas; Ntziachristos, Vasilis (2011): Volumetric real-time multispectral optoacoustic tomography of biomarkers. In: *Nat Protoc* 6 (8), S. 1121–1129. DOI: 10.1038/nprot.2011.351.

Razansky, Daniel; Deliolanis, Nikolaos C.; Vinegoni, Claudio; Ntziachristos, Vasilis (2012): Deep tissue optical and optoacoustic molecular imaging technologies for pre-clinical research and drug discovery. In: *Curr Pharm Biotechnol* 13 (4), S. 504–522.

Roovers, Rob C.; van Dongen, Guus A. M. S.; van Bergen en Henegouwen, Paul M. P. (2007): Nanobodies in therapeutic applications. In: *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9 (4), S. 327–335.

Roovers, Rob C.; Vosjan, Maria J. W. D.; Laeremans, Toon; el Khoulati, Rachid; Bruin, Renée C. G. de; Ferguson, Kathryn M. et al. (2011): A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. In: *Int. J. Cancer* 129 (8), S. 2013–2024. DOI: 10.1002/ijc.26145.

Scheuplein, Felix; Rissiek, Björn; Driver, John P.; Chen, Yi-Guang; Koch-Nolte, Friedrich; Serreze, David V. (2010): A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes. In: *J. Autoimmun.* 34 (2), S. 145–154. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.08.012.

Scheuplein, Felix; Schwarz, Nicole; Adriouch, Sahil; Krebs, Christian; Bannas, Peter; Rissiek, Björn et al. (2009): NAD+ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. In: *J. Immunol.* 182 (5), S. 2898–2908. DOI: 10.4049/jimmunol.0801711.

Seman, Michel; Adriouch, Sahil; Scheuplein, Felix; Krebs, Christian; Freese, Dunja; Glowacki, Gustavo et al. (2003): NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. In: *Immunity* 19 (4), S. 571–582.

Taruttis, Adrian; Ntziachristos, Vasilis (2012): Translational optical imaging. In: *AJR Am J Roentgenol* 199 (2), S. 263–271. DOI: 10.2214/AJR.11.8431.

Tchouate Gainkam, Lea Olive; Caveliers, Vicky; Devoogdt, Nick; Vanhove, Christian; Xavier, Catarina; Boerman, Otto et al. (2011): Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. In: *Contrast Media Mol Imaging* 6 (2), S. 85–92. DOI: 10.1002/cmmi.408.

Thiele, H. G.; Haag, F.; Nolte, F.; Lischke, C.; Bauschus, S. (1997): Expression profiles of RT6 and other T lymphocyte surface markers in the black rat (Rattus rattus). In: *Transplant Proc* 29 (3), S. 1697–1698.

Ulrichts, Hans; Silence, Karen; Schoolmeester, Anne; Jaegere, Peter de; Rossenu, Stefaan; Roodt, Jan et al. (2011): Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. In: *Blood* 118 (3), S. 757–765. DOI: 10.1182/blood-2010-11-317859.

Vosjan, Maria J. W. D.; Perk, Lars R.; Roovers, Rob C.; Visser, Gerard W. M.; Stigter-van Walsum, Marijke; van Bergen en Henegouwen, Paul M. P.; van Dongen, Guus A. M. S. (2011): Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with 68Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. In: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38 (4), S. 753–763. DOI: 10.1007/s00259-010-1700-1.

Vosjan, Maria J. W. D.; Vercammen, Jo; Kolkman, Joost A.; Stigter-van Walsum, Marijke; Revets, Hilde; van Dongen, Guus A. M. S. (2012): Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. In: *Mol. Cancer Ther.* 11 (4), S. 1017–1025. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0891.

Wang, J.; Nemoto, E.; Dennert, G. (1996): Regulation of CTL by ecto-nictinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein. In: *J. Immunol.* 156 (8), S. 2819–2827.

Weissleder, R.; Mahmood, U. (2001): Molecular imaging. In: *Radiology* 219 (2), S. 316–333.

Weissleder, Ralph; Ntziachristos, Vasilis (2003): Shedding light onto live molecular targets. In: *Nat. Med.* 9 (1), S. 123–128. DOI: 10.1038/nm0103-123.

Wesolowski, Janusz; Alzogaray, Vanina; Reyelt, Jan; Unger, Mandy; Juarez, Karla; Urrutia, Mariela et al. (2009): Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. In: *Med Microbiol Immunol* 198 (3), S. 157–174. DOI: 10.1007/s00430-009-0116-7.

Wu, T. T.; Johnson, G.; Kabat, E. A. (1993): Length distribution of CDRH3 in antibodies. In: *Proteins* 16 (1), S. 1–7. DOI: 10.1002/prot.340160102.

Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Koch-Nolte und Herrn Dr. Bannas, die mir nicht nur die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglichten, sondern auch durch ihre ausgezeichnete Betreuung während der Durchführung dieses Projekts stets zur Seite standen. Durch ihr Engagement war es mir möglich, auch über das eigene Projekt hinaus Einblicke in die spannenden Gebiete der bildgebenden Verfahren und der Immunologie zu erhalten.

Danken möchte ich auch Frau Schmid und Herrn Lenz, für die freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre Geduld und die Bereitschaft bei aufwändigeren Versuchen eigene Pläne zurückzustellen.
Herrn Dr. Rissiek danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft, insbesondere in Fragen der Durchflusszytometrie und dem Umgang mit murinen Lymphozyten.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Institus für Immunologie, wie auch Herrn Prof Dr. Fleischer danken. Die gute Stimmung im Labor, der rege Gedankenaustausch und nicht zuletzt die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Campus Forschung haben mir große Freude bereitet.

Frau Dr. Katja Hochgräfe danke ich für die gestellte Expertise bei den Imaging Versuchen, die ohne ihre Hilfe und zeitliche Flexibilität nicht zu bewerkstelligen gewesen wären.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Adam, der durch seine Unterstützung mein bestehendes Interesse am Fach der Radiologie deutlich stärkte.

Meinen Eltern danke ich für ihre beständige Unterstützung und die Ermunterung meine Ideen und Wünsche zu verfolgen.

Ich danke den Mitgliedern des SFB 841 „Leberentzündung: Infektion, Immunregulation und Konsequenzen“ der DFG für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und für die Möglichkeit, an den vielfältigen angebotenen Seminaren und Fortbildungsveranstaltungen teilzunehmen.

Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitte nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift