



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Bachelorthesis

**Auswirkung einer Antikörper- oder viralen Liganden-vermittelten
Intervention mit Xpr1 auf T-Zell-Effektorfunktionen**

Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von

Renata Aguilar



Hamburg

09. Sep. 2024

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Julien Béthune (Life Science, HAW Hamburg)
2. Gutachter: Herr Dr. Reiner Mailer (Institut Klinische Chemie, UKE)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des
Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Inhalt

Zusammenfassung.....	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. T-Zellen.....	1
1.2. CD4+ T Helferzellen	2
1.2.1. T-Helfer 1 Zellen (Th1 Zellen)	3
1.2.2. T-Helfer 2 Zellen (Th2 Zellen)	3
1.2.3. T-Helfer 17 Zellen (Th17-Zellen)	4
1.2.4. Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg)	4
1.3. Xenotroper und polytroper Retrovirus-Rezeptor 1 (XPR1).....	6
1.4. Xenotroper Virus-abgeleiteter Ligand (XVDL) & Polytroper Virus-abgeleiteter Ligand (PVDL)	7
1.5. Zielsetzung	8
2. Materialien	9
3. Methoden und Durchführung	13
3.1. Expression von XVDL und PVDL.....	13
3.1.1. Hitzeschocktransformation	13
3.1.2. Überexpression von XVDL und PVDL	14
3.1.3. Zelllyse	15
3.2. High performance liquid chromatography (HPLC).....	15
3.3. Umpufferung und Aufkonzentrierung von XVDL und PVDL.....	16
3.3.1. Amicon Ultra-15 10K Zentrifugen-Filtereinheit.....	17
3.3.2. PD10 Entsalzungs-Säule.....	18
3.3.3. Dialyse-Kassette	18
3.4. Sodiumdodecylsulfat–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	19
3.4.1. Gelegießen	20
3.5. Coomassie-Färbung	20
3.6. Western-Blot.....	20
3.7. Protein-Konzentrationsbestimmung	22
3.7.1. Bichinoninsäure (BCA) Assay	22
3.7.2. Bradford Assay	23
3.8. CD4+ T-Zell-Isolation aus Milzen.....	23

3.9. Zellen zählen	25
3.10. Stimulation von T-Zellen für Proliferationsanalyse	25
3.11. Proliferationsanalysen	27
3.11.1. Carboxyfluorescein-Succinimidylester Färbung (CFSE-Färbung)	27
3.11.2. Ki67 Färbung	27
3.11.3. Behandlung der Zellen	28
3.12. Durchflusszytometrie (FACS).....	28
3.13. Gating Strategie.....	30
4. Ergebnisse.....	31
4.1. Aufreinigung der Proteine mittels HPLC	31
4.2. Umpufferung	32
4.2.1. Amicon	32
4.2.2. Western-Blot	36
4.2.3. PD10	38
4.2.4. Dialyse	40
4.3. Proliferationsassays	42
4.3.1. PD10 vs Dialyse.....	42
4.3.2. Vergleich von Proliferationsassays mit CFSE und Ki67	43
4.3.3. Proliferationsassays mit Ki67	44
5. Diskussion	47
5.1. PVDL- und XVDL-Herstellung.....	47
5.2. Proliferationsassays	48
6. Anhang	51
6.1. Verlauf der Aufreinigung von PVDL und XVDL	51
6.2. Plasmidmap	55
7. Literaturverzeichnis	56
8. Danksagung	58
9. Eidesstattliche Erklärung.....	59

Zusammenfassung

Die Fragestellung dieser Studie fokussiert sich auf die Auswirkung von mit Xpr1 interagierenden Liganden oder Antikörpern auf die T-Zell-Effektorfunktionen. Dafür wurde zuerst die Herstellung der PVDL- und XVDL-Proteine durch die Transformation und die Überexpression von rekombinanten Liganden XVDL und PVDL in *E.coli* durchgeführt. Die PVDL- und XVDL-Proteine wurden mittels HPLC aufgereinigt. Danach wurden die Proteine mit verschiedenen Methoden wie Amicon, PD10 sowie Dialyse umgepuffert, dazu wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Um die Konzentration der hergestellten PVDL- und XVDL-Proteine zu bestimmen, wurde der Bradford Assay verwendet. Darüber hinaus wurden aus Milzen von Mäusen CD4+ T-Zellen mit *magnetic activated cell sorting* (MACS) isoliert. Zur Beantwortung der Forschungsfrage wurden die isolierten CD4+ T-Zellen mit den hergestellten PVDL- und XVDL-Liganden sowie mit dem α -XPR1-Antikörper 2G8 und der Isotypkontrolle IgG1k behandelt. Die T-Zellen wurden mit α -CD3 und α -CD28 stimuliert und für 72 h bei 37 ° C inkubiert. Schließlich wurden die Proliferationsassays mittels Ki67-Färbung im FACS analysiert.

Die Untersuchung ergab, dass die rekombinanten Liganden XVDL und PVDL für die Behandlung erfolgreich hergestellt wurden. Dazu wurde festgestellt, dass XVDL und PVDL sowie der α -XPR1-Antikörper 2G8 und die Isotypkontrolle IgG1k keinen Einfluss auf die Proliferation von CD4+ T-Zellen aufweisen. Diese Ergebnisse weichen von den bisherigen Erkenntnissen von Mailer *et al.* 2021 für die Verwendung von XVDL und PVDL für die Modulation von XPR1 in Thrombozyten ab und eröffnen eine neue Perspektive auf die Behandlung von mit Xpr1 interagierenden Liganden oder Antikörper in T-Zellen. Die Studie führt zur Schlussfolgerung, dass die Intervention von XPR1-Liganden und -Antikörpern auf die T-Zelleffektorfunktionen keinen signifikanten Einfluss hatte. Diese Daten könnten mit anderen Methoden validiert werden, jedoch liegt die Schlussfolgerung nahe, dass XPR1-Modulation mit viralen Liganden und Antikörpern, anders als in Thrombozyten, in T-Zellen nicht trivial ist.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der T-Zell-Aktivierung (erstellt mit BioRender, modifiziert nach Janeway Immunologie, 2018).	2
Abbildung 2: Darstellung der Aktivierung und Differenzierung von CD4+ T-Zellen (erstellt mit BioRender, modifiziert nach Janeway Immunologie, 2018).	5
Abbildung 3: Darstellung der Struktur des menschlichen XPR1-Proteins (modifiziert nach Yan et al. 2024).	6
Abbildung 4:Klonierung und rekombinante Expression eines XPR1-blockierenden Liganden (erstellt mit BioRender, modifiziert nach Mailer et al. 2021).	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der XVDL-pTrcHisB und PVDL-pTrcHisB-Plasmide (erstellt mit BioRender).	13
Abbildung 6: CD4+ T-Zell-Isolation (erstellt mit BioRender).	26
Abbildung 7: Gating Strategie für Proliferationsanalyse.	30
Abbildung 8: Exemplarischer Verlauf der Proteinaufreinigung von XVDL.	31
Abbildung 9: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (PVDL).	33
Abbildung 10: Verlauf der Aufreinigung von PVDL.	33
Abbildung 11: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (XVDL).	34
Abbildung 12:Verlauf der Aufreinigung von XVDL.	35
Abbildung 13: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel von Überstand und Pellet nach Umpufferung mit Amicon.	36
Abbildung 14: Western Blot von PVDL und XVDL.	37
Abbildung 15: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (PVDL, PD10-Säule).	38
Abbildung 16: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (XVDL, PD10-Säule).	39
Abbildung 17: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (PVDL, Dialyse).	41
Abbildung 18: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (XVDL, Dialyse).	41
Abbildung 19:Vergleich zwischen PD10- und Dialysemethode.	42
Abbildung 20:Vergleich von der Überlebensrate der mit CFSE gefärbten oder ungefärbten CD4+ T-Zellen.	43
Abbildung 21:Anteil und relativer Anteil der Ki67+ T-Zellen bei der XVDL- und PVDL-Behandlung.	45
Abbildung 22:Anteil und relativer Anteil der Ki67+ T-Zellen bei der XVDL- und PVDL-Behandlung.	46
Abbildung 23: Verlauf der Aufreinigung von PVDL (PD10).	51
Abbildung 24: Verlauf der Aufreinigung von XVDL (PD10).	52
Abbildung 25: Verlauf der Aufreinigung von PVDL (Dialyse).	53
Abbildung 26: Verlauf der Aufreinigung von XVLD (Dialyse).	54
Abbildung 27:Plasmidmap (Hersteller Thermo Fisher Scientific, erstellt von Thermo Fisher Scientific).	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:Verwendete Geräte.....	9
Tabelle 2: Verwendete Software.....	10
Tabelle 3: Verwendete Zellen und Plasmiden.....	10
Tabelle 4:Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	10
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Medien.....	11
Tabelle 6:Verwendete Verbrauchsgegenstände.....	12
Tabelle 7: Verwendete Antikörper.....	12
Tabelle 8: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel.....	20

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	antigenpräsentierenden Zellen
BCA	Bichinoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CED	chronische-entzündliche-Darmerkrankung
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	fätales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zellen
KH $_2$ PO $_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Na $_2$ HPO $_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH $_2$ PO $_4$	Natriumdihydrogenphosphat
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NK	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PolyP	Polyphosphat
PVDL	Polytroper Virus-abgeleiteter Ligand
RBC	<i>Red blood cell</i>
RBD	Rezeptorbindungsdomänen
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	<i>Side Scatter</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	T-Helfer
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TSPs	thymische Seeding Progenitoren
TZR	T-Zellen-Rezeptor
X- und P- MLV	Xenotrope und polytrope murine Leukämie-Retroviren
XPR1	Xenotroper und polytroper Retrovirus-Rezeptor 1
XVDL	Xenotroper Virus-abgeleiteter Ligand

1. Einleitung

1.1. T-Zellen

T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, sind von großer Bedeutung für das adaptive Immunsystem. Sie sind essenziell dafür, dass unser Immunsystem gezielt z.B. mit Bakterien oder Viren infizierte Zellen, körperfremde Pathogene oder maligne körpereigene Zellen erkennen und bekämpfen kann. T-Zellen tragen also dazu bei, dass der Wirt gesund bleibt und verschiedene Krankheiten verhindert werden. Dies wird durch vielfältige verschiedene Effektorfunktionen bewerkstelligt. Allen zugrunde liegt dabei die Identifizierung von Peptidantigenen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) an der Zelloberfläche. Die Peptidantigene entstehen in antigenpräsentierenden Zellen (APZs) durch intrazellulären Abbau von Proteinen und werden durch Interaktion mit MHC-Molekülen an der Zelloberfläche für den TZR zugänglich präsentiert, was als Antigenpräsentation bezeichnet wird (Waldman, Fritz, et Lenardo 2020).

Bei der Antigenpräsentation sind drei Signale relevant (siehe Abbildung 1). Das erste Signal entsteht durch Interaktion zwischen dem TZR-Komplex, der unter anderem CD3 sowie CD4 oder CD8 enthält, und dem MHC-Peptidkomplex auf der APZ. Das zweite Signal erfolgt durch die Kostimulation, die durch Interaktion von CD28 auf der T-Zelle und CD80/86 auf die APZ-Signale weitergibt. Außerdem wird der Aktivierungsprozess durch die Zytokinumgebung moduliert, wobei insbesondere IL2 entscheidend für eine erfolgreiche Stimulation ist (Murphy et Weaver 2018).

Im adaptiven Immunsystem wird zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen unterschieden. CD4+ T-Zellen, als T-Helferzellen bezeichnet, sind für die Koordination der Immunantwort sowie die Aktivierung anderer Immunzellen verantwortlich, während CD8+ T-Zellen, zytotoxische T-Zellen genannt, infizierte oder maligne Zellen direkt zerstören. Die Differenzierung der CD4+ T-Zellen sowie der Mechanismus der T-Zell-Effektorfunktionen wird im Folgenden näher erläutert (O'Shea et Paul 2010).

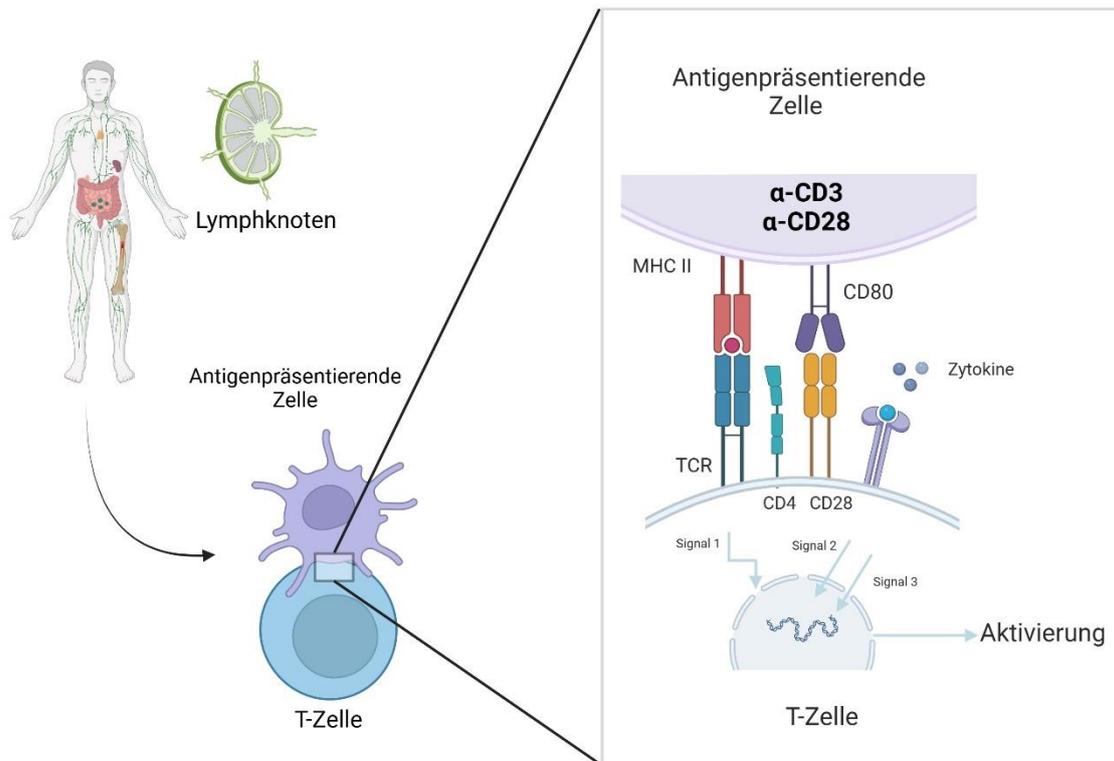


Abbildung 1: Mechanismen der T-Zell-Aktivierung (erstellt mit BioRender, modifiziert nach Janeway Immunologie, 2018).

Darstellung der molekularen Interaktion zwischen der antigenpräsentierenden Zelle und einer T-Zelle. MHC II bindet an den T-Zell-Rezeptor, was das erste Signal liefert. Zusätzlich bindet das kostimulatorische Molekül CD80 an CD28, was das zweite Signal darstellt. Zytokine, die von anderen Immunzellen sezerniert wurden und in der extrazellulären Umgebung vorliegen, liefern das dritte Signal zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle, dadurch fängt eine effektive Immunantwort an. α -CD3 und α -CD28 sind Antikörper, die CD3 und CD28 binden. α -CD3 stimuliert Antigen-unabhängig den TZR, während α -CD28 das Kostimulationssignal liefert.

1.2. CD4+ T Helferzellen

Die CD4+ T Helferzellen sind eine heterogene Gruppe von Immunzellen, die die Immunantwort maßgeblich beeinflussen, da sie in der Lage sind, eine Vielzahl anderer Zelltypen zu aktivieren oder zu inhibieren. Durch die Wechselwirkung vom T-Zell-Rezeptor mit dem Antigen-MHC II-Komplex auf APZs wird eine Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zu IL-2-Auslösung, Proliferation und Differenzierung der naiven CD4+-Zellen in spezifische Effektorzellen führt. Hierbei können verschiedene Subpopulationen (siehe Abbildung 2) entstehen, die sich durch ihre Oberflächenmoleküle, ausgeschüttete Zytokine und spezifische Transkriptionsfaktoren unterscheiden (Sun et al. 2023). Neben den klassischen T-Helfer 1 und T-Helfer 2 Zellen kommen darunter die T-Helfer 17 sowie induzierte regulatorische T-Zellen vor (Luckheeram et al. 2012).

1.2.1. T-Helfer 1 Zellen (Th1 Zellen)

Die Zytokine Interleukin 12 (IL12) und Interferon γ (IFN γ) spielen eine essenzielle Rolle bei der Differenzierung von T-Helfer 1-Zellen (Th1-Zellen) (Trinchieri, Pflanz, et Kastelein 2003). Das von aktivierten APZs produzierte IL12 induziert die Produktion von IFN γ durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Darüber hinaus ermöglicht es die vollständige Differenzierung der Th1-Zellen durch das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren. Der wichtigste Faktor ist hierbei der T-box-Transkriptionsfaktor (T-bet), da T-bet spezifische Gene aktiviert, die nur die Differenzierung in Th1 Zellen ermöglichen, während die Differenzierung in T-Helfer 2 (Th2)- und T-Helfer 17(Th17) -Zellen unterdrückt wird (Luckheeram et al. 2012).

Die wichtigsten von Th1 ausgeschüttete Effektor-Zytokine sind TNF α , IFN γ , Lymphotoxin α (L α), und IL2. Th1-Zellen haben wichtige Effektorfunktionen, einerseits bekämpfen sie intrazelluläre Krankheitserreger, andererseits sind sie mit organspezifischer Autoimmunität verbunden (Prete 1992). Außerdem sind Th1-Zellen für die Aktivierung von Phagozyten wie Makrophagen verantwortlich, um Krankheitserreger zu beseitigen (Boehm et al. 1997). Zudem sind Th1-Zellen mit Autoimmunerkrankungen assoziiert, sodass diese Krankheiten durch Hemmung von Th1-Zellen behandelt werden könnten (Suen et al. 1997). Ebenso unterstützt von TH1-Zellen exprimiertes IL2 die Proliferation von CD8+ T-Zellen, was dazu führt, dass diese CD8+ T-Zellen infizierte Zellen erkennen und zerstören und CD8+ Gedächtniszellen gebildet werden, wodurch die sekundäre Immunantwort verstärkt wird (Williams, Tyznik, et Bevan 2006).

1.2.2. T-Helfer 2 Zellen (Th2 Zellen)

Die Zytokine IL4 und IL2 beeinflussen maßgeblich die Differenzierung von T-Helfer 2 (Th2) - Zellen. Das Signalmolekül STAT6 wird durch IL4 induziert und hat eine Schlüsselrolle, indem es den Transkriptionsfaktor GATA3 reguliert, welcher ausschlaggebend für die Determination zum Th2-Subtyp ist. Th2-Zellen werden durch GATA3 induziert, während die Th1-Differenzierung gehemmt wird. GATA3 ist für die verstärkte Produktion von Th2-Zytokinen wie IL4 und IL5 verantwortlich (Luckheeram et al. 2012).

Die wichtigsten Effektor-Zytokine, die von Th2-Zellen hergestellt werden, sind IL4, IL5, IL9, IL13, IL10, IL25 und Amphiregulin. Th2-Zellen haben eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr gegen extrazelluläre Parasiten (Stark, Tibbitt, et Coquet 2019). Sie sind außerdem beteiligt an der Regulation und Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder allergischen, entzündlichen Erkrankungen wie Asthma (Nakayama et al. 2017).

Außerdem haben Th2-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Antikörper-Produktion durch B-Zellen und können die Proliferation von Epithelzellen beeinflussen (Luckheeram et al. 2012).

1.2.3. T-Helfer 17 Zellen (Th17-Zellen)

Unter den Einfluss verschiedener Zytokine wie IL6; IL21, IL23 und TGF- β sowie des Transkriptionsfaktors ROR γ t wird die Differenzierung der T-Helfer 17 (Th17) -Zellen durchgeführt. Dafür ist nicht nur TGF- β wesentlich, sondern auch IL6 (Luckheeram et al. 2012).

Th17-Zellen haben eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (Annunziato et al. 2007). Außerdem sind sie von entscheidender Bedeutung für die Entstehung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis sowie Systemische Lupus Erythematoses) und (z.B. Atherosklerose und chronische-entzündliche-Darmerkrankung (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) (Zambrano-Zaragoza et al. 2014).

1.2.4. Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg)

Natürliche regulatorische T-Zellen (Treg) und induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs) sind von entscheidender Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und der Regulation der Immunantwort. Durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 wird die Differenzierung von iTregs kontrolliert. TGF- β und IL2 sind für die Differenzierung von iTreg entscheidend. iTregs synthetisieren inhibitorische Zytokine wie TGF- β , IL10 und IL35, welche dazu beitragen, die Immunantwort zu unterdrücken (Sun et al. 2023). So kann verhindert werden, dass chronisch-entzündliche Erkrankungen entstehen oder Immunzellen körpereigene und nicht-pathogene Strukturen (z.B. die Darmflora) angreifen.

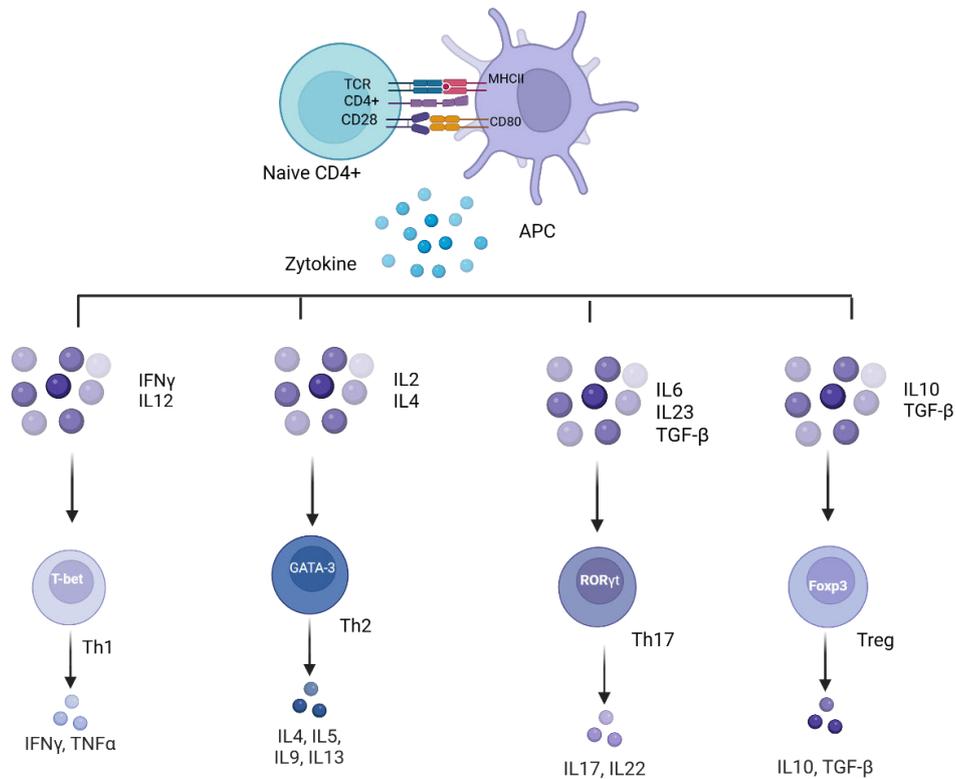


Abbildung 2: Darstellung der Aktivierung und Differenzierung von CD4+ T-Zellen (erstellt mit BioRender, modifiziert nach Janeway Immunologie, 2018).

Die antigenpräsentierenden Zellen (APZs) präsentieren mittels MHC II Komplexen Antigenpeptide an den CD4 T-Zellrezeptor (TZR). Dies wird mit einer Kostimulation durch Interaktion von CD80 und CD28 begleitet. Verschiedene Kombinationen von extrazellulär vorhandenen Zytokinen induzieren die Differenzierung naiver T-Zellen in verschiedene Subpopulationen (Th1, Th2, Th17 und iTreg). Zentrale Transkriptionsfaktoren (T-bet, GATA3, RORγt und Foxp3) kontrollieren die Expression von für die jeweilige Subpopulation typischen Effektorzytokinen.

1.3. Xenotroper und polytroper Retrovirus-Rezeptor 1 (XPR1)

Der Xenotrope und polytrope Retrovirus-Rezeptor 1 (XPR1) (siehe Abbildung 3) ist ein 10-Pass-Transmembranprotein, das aus 696 Aminosäuren besteht. Initial wurde XPR1 als Zelloberflächenrezeptor für xenotrope und polytrope murine Leukämie-Retroviren (X- und P-MLV) beschrieben. In einer aktuellen Studie wurde XPR1 als wichtiger Regulator von Polyphosphat (PolyP) in Thrombozyten und als Phosphat-Exporter beschrieben und spielt vermutlich auch eine Rolle bei der Phosphat-Homöostase in anderen Zellentitäten (Mailer et al. 2021).

In vorläufigen Daten der AG Mailer wurde herausgefunden, dass ein konditioneller Knockout von *Xpr1* in T-Zellen unter anderem zur Veränderung der Signalwege des TZR führt. Hierbei wird die mTOR-Signalweiterleitung verstärkt, die Calcium- und NFAT-Signalweiterleitung jedoch vermindert, was die Effektorfunktionen beeinflusst und eine schnellere Proliferation zur Folge hat. Außerdem wurde mehr IL2 exprimiert und eine stärkere Differenzierung in Th1- und Th22-Zellen mit einer erhöhten Expression von TNF α , IFN γ und IL-22 beobachtet (noch nicht publiziert).

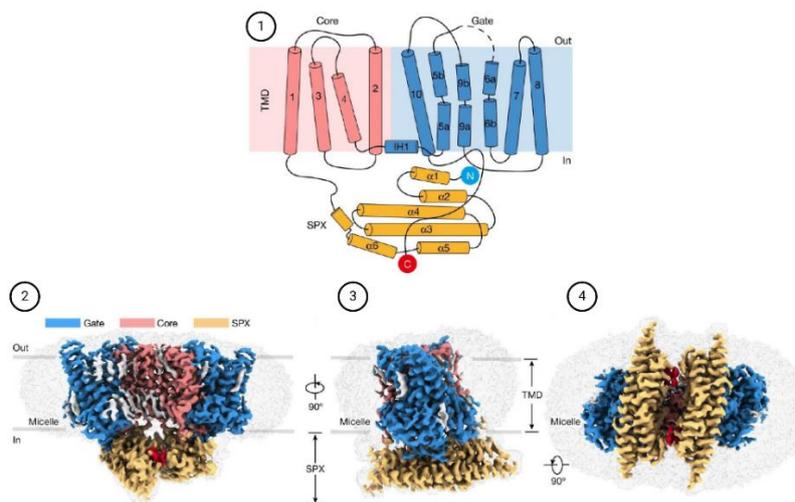


Abbildung 3: Darstellung der Struktur des menschlichen XPR1-Proteins (modifiziert nach Yan et al. 2024).

Die Topologie von XPR1 wird in der (1) präsentiert, wobei die drei funktionellen Domänen mit verschiedenen Farben markiert sind. Der zentrale Teil der Transmembrandomänen (TMD), Zentraldomäne (rot) genannt, besteht aus vier Transmembransequenzen (TM 1-4). Die Kanaldomäne (blau) besteht aus sechs weiteren Transmembransequenzen (TM 5-10). Die auf der zyttoplasmatische Seite des Proteins gelegene SPX-Domäne ist aus sechs Alpha-Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) zusammengesetzt. Im unteren Teil der Abbildung wird die Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur von XPR1 in drei unterschiedlichen Ansichten dargestellt. Die klar voneinander abgegrenzten drei Domänen sind in der frontalen Ansicht in (2) zu beobachten. Das Protein ist in (3) seitlich zu sehen, wobei die vertikale Anordnung der Transmembrandomäne innerhalb der grau dargestellten Membran in den Milzen gezeigt wird. Anschließend wird die funktionelle Interaktion der Zentraldomäne, der Kanaldomäne, sowie der SPX-Domäne in (4) veranschaulicht.

1.4. Xenotroper Virus-abgeleiteter Ligand (XVDL) & Polytroper Virus-abgeleiteter Ligand (PVDL)

Die Auswirkung von virus-abgeleiteten Liganden von XPR1 kann mit Nutzung der rekombinanten Liganden XVDL und PVDL untersucht werden. Diese sind von den Rezeptorbindungsdomänen (RBD) der Hüllproteine xenotroper (X-MLV) und polytroper Maus-Leukämie-Viren (P-MLV) abgeleitet. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, sind die Liganden aus einer Rezeptorbindungsdomäne (RBD), einer transmembranen Untereinheit (TM) und einem zytoplasmatischen Schwanz (TC) aufgebaut. Darüber hinaus sind sie mit einem N-terminalen 6xHis-Tag fusioniert, was dazu führt, dass diese einfach aufzureinigen und nachzuweisen sind. Die durch Verwendung der ersten N-terminalen 259 Aminosäuren (für X-MLV) und 262 Aminosäuren (für P-MLV) der RBDs erzeugten Liganden wurden in *E. coli* exprimiert, um sie für diese Arbeit zu nutzen (Mailer et al. 2021).

In der Arbeit von Mailer *et al.* 2021 wurde die Funktion von XPR1 mithilfe von XVDL und PVDL in Thrombozyten erforscht. Es ist erkannt worden, dass XPR1 durch XVDL, aber nicht durch PVDL gehemmt wird, was durch Veränderungen im Phosphatexport und Polyphosphat-Leveln gezeigt wurde. Aus der Studie geht hervor, dass XPR1 ein wichtiger Regulator des Polyphosphatstoffwechsels in Thrombozyten ist. Im Vergleich zu der Studie von Mailer *et al.* 2021 wird in dieser Arbeit die Auswirkung von XVDL und PVDL auf die Funktion der T-Zellen getestet.

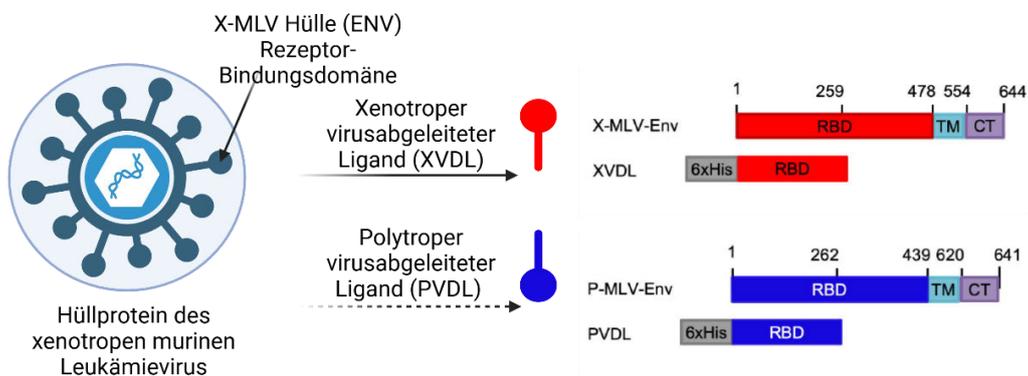


Abbildung 4: Klonierung und rekombinante Expression eines XPR1-blockierenden Liganden (erstellt mit BioRender, modifiziert nach Mailer *et al.* 2021).

Die rekombinanten Liganden XVDL und PVDL stammen aus den Rezeptorbindungsdomänen (RBD) der Hüllproteine xenotroper (X-MLV) und polytroper Maus-Leukämie-Viren (P-MLV). Die Liganden bestehen aus einer Rezeptor-Bindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Schwanz. Um die rekombinanten Liganden besser herzustellen und nachzuweisen, wurde ein N-terminaler 6xHis-Tag mit den ersten 259 Aminosäuren (für X-MLV) bzw. 262 Aminosäuren (für P-MLV) der RBDs fusioniert.

1.5. Zielsetzung

Der Studie von Mailer *et al.* (2021) zufolge zielt die vorliegende Arbeit auf die Erforschung der Auswirkung der viralen Liganden XVDL und PVDL sowie der Antikörper α -XPR1 (2G8) und IgG1k auf die T-Zell-Effektorfunktionen ab. Dazu erfolgte die Überexpression der rekombinanten Liganden XVDL und PVDL in *E.coli*. Hochleistungsflüssigchromatographie wurde für die Aufreinigung von XVDL und PVDL eingesetzt. Um die erfolgreiche Aufreinigung von XVDL und PVDL vor der Behandlung der T-Zellen zu überprüfen, wurden die Proteine XVDL und PVDL nach der Umpufferung mittels SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert.

Für die funktionellen Analysen wurden primäre, murine T-Zellen aus Mäuse-Milzen mittels *magnetic activated cell sorting* (MACS) isoliert, woraufhin die erhaltenen CD4+ T-Zellen mit den hergestellten viralen Liganden XVDL und PVDL sowie mit dem vorliegenden α -XPR1-Antikörper 2G8 und der Isotypkontrolle IgG1k behandelt wurden. Nach Stimulation der T-Zellen für drei Tage wurden Proliferationsassays durchgeführt, um T-Zell-Effektorfunktionen zu adressieren.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen die Umsetzbarkeit einer pharmakologischen Intervention von XPR1 in CD4+ T-Zellen charakterisieren und geben Aufschluss darüber, ob eine Modulation der Immunantwort durch *Targeting* von XPR1 in Zukunft realistisch sein kann.

2. Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	ALS-120-4	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Bakterienschüttelinkubator	HAT Ecotron	INFORS, Bottmingen
BioRad Imaging System	Image Lab „ChemiDoc MP“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blotting Transfer System	Creterion Blotter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bunsenbrenner	Labogaz 470	Camping Gaz, Hungen-lheiden
Eismaschine	-	Hoshizaki, Willich
Elektrophoreseapparatur	Mini-PROTEAN System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluorescence-Activated Cell Sorting	BD FACSCanto™II	BD-Bio Sciences, Heidelberg
Heizbad	-	GLF, Burgwedel
Heizblock-Schüttel-inkubator	ThermoMixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
HPLC-Anlage	Äkta Start	Cytiva, Baden-Württemberg
Inverse Mikroskop	Primovert	ZEISS, Oberkochen
Magnetrührer	IKA RH basic 2	Janke und Kunkel, Staufen
MilliQ-Anlage	PURELAB® flex	ELGA, Celle
Mini-Zentrifuge	Color Sprout® Plus	Biozym Scientific GmbH
pH-Meter	WTW™ inoLab 7110	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Plattenreader	TECAN Spark® Cyto	Tecan Group AG, Männedorf
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Sterilbank	Heraeus Intruments	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Trockenschrank	Heraeus Fuction Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Ultraschlidesintegrator	SONOPULS MS 73	BANDELIN electronic GmbH, Berlin
Vortexter	Certomat MV	B. Braun Biotech, Melsungen
Zellinkubator	HeraCell	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Zentrifuge	Heraeus MEGAFUGE 8 Centifuge MIKRO 220 Sigma 4-16K	Thermo Fisher Scientific, Waltham Hettich, Tuttlingen Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

Tabelle 2: Verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
<i>BD FACSCanto™ Clinical Software</i>	BD-Bio Sciences, Heidelberg
<i>GraphPad Prism 10</i>	GraphPad Software, La Jolla
<i>Image Lab Software</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Tecan Spark Control™</i>	Tecan Group AG, Männedorf

Tabelle 3: Verwendete Zellen und Plasmiden.

Bezeichnung	Hersteller
BL21(DE3) E.Coli	Biolabs new England
PVDL-pTrcHisB	Thermo Fisher Scientific, Waltham
XVDL- pTrcHisB	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
4xLämmi Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
A/B 30% 29:1 [ml]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
AcOH	Merck Millipore, Darmstadt
Ampicillin	Merck Millipore, Darmstadt
APS [µl]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BCA-Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Comassie Blau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
EtOH	Th. Geyer, Renningen
FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis
Imidazole	Merck Millipore, Darmstadt
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Merck Millipore, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore, Darmstadt
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Carl Roth, Karlsruhe
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis
<i>Minimal Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
NaH ₂ PO ₄	Merck Millipore, Darmstadt
PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Peroxid/Luminol-Substrat (Membran SDS-PAGE)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RBC	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RPMI	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RPMI 1640 + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham
SDS 20% [µl]	Applichem, Darmstadt
SOC	Thermo Fisher Scientific, Waltham
TEMED [µl]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tris 1.0M pH 6.8 [ml]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris 1.5M pH 8.8 [ml]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypan Blau	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis
Zombie Violet	BioLegend, Inc, London
α -PE-Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 7.4
Elutionspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7.4
Entfärbungslösung	ddH ₂ O 10 % (v/v) EtOH 7.5 % (v/v) AcOH
Jurkat Medium	RPMI 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Laufpuffer	ddH ₂ O 25 mM Tris 193 mM Glycin 0.1 % (v/v) SDS
TBS	ddH ₂ O 20 mM Tris 150 mM NaCl pH 7.6
TBS-T	ddH ₂ O 20 mM Tris 150 mM NaCl 0.1 % (v/v) Tween20 pH 7.6
<i>T-cell-Medium</i>	RPMI 1640 + GlutaMAX 10 % (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) Minimal Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA) 1 % (v/v) L-Glutamin 10 mM HEPES 1 mM Pyruvat 50 μ M β -Mercaptoethanol
Transfer Puffer	ddH ₂ O 25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % (v/v) MeOH

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsgegenstände.

Bezeichnung	Hersteller
24-well-Platte	Corning Incorporated
96-well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Amicon Ultra 15 10K Zentrifugation Filtereinheiten	Merck Millipore, Darmstadt
Bechergläser	Schott, Mainz
Dialyse Kassette	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Durchflusszytometrie Röhren	Sarstedt, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Falcons 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Parafilm	Bemis, United Kingdom
PD10 Säule	Cytiva, Baden-Württemberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 7: Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Spezies	Anwendung	Hersteller
α -CD28	Murines CD28	37.51	Hamster	1:500	BioLegend, Inc, London
α -CD3	Murines CD3-epsilon	145-2C11	Hamster	1:200	BioLegend, Inc, London
α -CD4-PE	Murines CD4	GK1.5	Ratte	1:200	BioLegend, Inc, London
α -His-Tag	6x His-Tag	-	Kaninchen	1:1,000	Cell Signaling, Cambridge
α -Ki67-PE-Vio770	Humanes/Murines Ki67	REA183	Mensch	1:50	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3. Methoden und Durchführung

3.1. Expression von XVDL und PVDL

3.1.1. Hitzeschocktransformation

Um die viralen Liganden XVDL und PVDL für eine Behandlung von T-Zellen nutzen zu können, müssen die Proteine erst hergestellt werden. Die Sequenzen liegen in pTrcHisB-Plasmiden (XVDL-pTrcHisB und PVDL-pTrcHisB) gespeichert vor, wie in Abbildung 5 dargestellt ist.

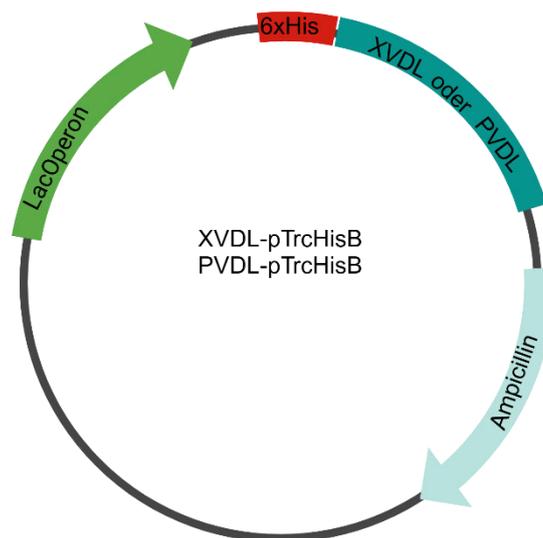


Abbildung 5: Schematische Darstellung der XVDL-pTrcHisB und PVDL-pTrcHisB-Plasmide (erstellt mit BioRender).

Die zur Transformation und Expression von den rekombinanten Proteinen verwendeten Plasmide setzen sich aus mehreren funktionellen Elementen zusammen, darunter das Lac-Operon, der 6xHis-Tag, die Sequenz des Zielproteins sowie Ampicillin. Das Lac-Operon dient zur transkriptionellen Kontrolle der Proteinexpression, wodurch die Lac-Repressor durch IPTG deaktiviert wird, um die Expression des Zielproteins zu beginnen. Die kurze Sequenz 6xHis-Tagtag wird an den XVDL oder PVDL-Sequenzen eingefügt, um die effiziente Reinigung des Zielproteins zu erreichen. XVDL und PVDL entsprechen den Sequenzen des Proteins, welches durch das Plasmid exprimiert wird. Durch das Ampicillin-Resistenzgen des Plasmides wird eine Selektion beim Wachsen der Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, ermöglicht.

Zuerst wurde eine Hitzeschocktransformation der Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* BL21 Bakterien vorgenommen. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C bilden sich kurzzeitig Poren in der bakteriellen Zellmembran, durch die die Plasmid-DNA in das Zellinnere gelangen kann.

Zu Beginn des Experiments wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 die Plasmide XVDL-pTrcHisB und PVDL-pTrcHisB transformiert. Dafür wurden zwei Gefäße mit je 50 µl der *E. coli* BL21 Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut.

Danach wurde jeweils 1 µl von den Plasmiden XVDL-pTrcHisB und PVDL-pTrcHisB in eine der Zellmischungen gegeben. Es wurde vorsichtig gemischt. Danach wurden die Bakteriensuspensionen für 30 min auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock für 10 s bei 42 °C ausgesetzt. Die Mischungen wurden für 5 min auf Eis inkubiert, bevor sie auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert wurden.

3.1.2. Überexpression von XVDL und PVDL

Zusätzlich zu den XVDL- und PVDL-Sequenzen ist eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin auf dem Plasmid kodiert. Durch Zugabe von Ampicillin zum Nährboden wachsen nach dem Ausplattieren nur Bakterien, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben. Ein solcher Einzelzellklon kann dann genutzt werden, um eine Flüssigkultur zu starten. Da die Sequenzen für XVDL bzw. PVDL unter Kontrolle des Lac-Operons exprimiert werden, kann durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) eine Überexpression von XVDL bzw. PVDL in der Bakterienzellkultur erreicht werden.

Zu den Bakteriensuspensionen nach der Hitzeschocktransformation wurden 950 µl SOC-Medium hinzugefügt. Die Mischungen wurden bei 37 °C für 60 min bei 250 U/min geschüttelt. Die Zellen wurden gründlich gemischt und mit SOC-Medium in einer 1:10-Verdünnungsreihe bis 1:10⁷ verdünnt. Anschließend wurden jeweils 50 µl von den Verdünnungen von XVDL- und PVDL-Bakteriensuspensionen auf die Agar-Platten (LB-Agar +100 µg/ml Ampicillin) mit einem Dreiösenausstrich ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach der Übernacht-Inkubation wurde ein Einzelzellklon von jeder Platte ausgewählt. Für die Überexpression der Proteine wurden zwei Kolben für jeweils XVDL- oder PVDL-Expression mit 100 ml LB-Medium und 100 µl Ampicillin (100 µl/ml) gefüllt. Daraufhin wurde der jeweils ausgewählte Klon mit einer Pipettenspitze gepickt und in einen Kolben hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min inkubiert.

Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen mit LB-Medium verdünnt, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 erreicht wurde. Daraufhin wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt und 4 h bei 37 °C inkubiert.

Die Kultur wurde in 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 4000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets bei -20 °C gelagert.

3.1.3. Zellyse

Die Pellets von XVDL- und PVDL-transformierten Bakterienkulturen wurden mit 30-50 ml Bindungspuffer (+ 1 Tablette EDTA-freie-Protease-Inhibitoren pro 50 ml Bindungspuffer) resuspendiert. Beide Suspensionen wurden 5-mal für 15 s mit 20 % Stärke sonifiziert, um die Zellen aufzuschließen. Im Anschluss wurden die Suspensionen bei 12.000 g für 20 min und bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände, welche die Proteine enthalten, wurden in neue Reaktionsgefäße transferiert und steril filtriert. Da die äußere Zellmembran durch die Sonifizierung zerstört wurde, bleiben die restliche Zellbestandteile in den Pellets. Daher wurden die Pellets verworfen.

3.2. High performance liquid chromatography (HPLC)

Um die XVDL- und PVDL-Proteine aufzureinigen, wurde eine Hochleistungsflüssigchromatographie („*high performance liquid chromatography*“ –HPLC) mit dem ÄKTA-System durchgeführt.

Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist eine Methode, die zur Trennung, Erkennung und Quantifizierung von Proteinlösungen verwendet wird. Dafür wurde die Proteinsuspension genutzt, die das Zielprotein enthält, welches mit einem His-Tag versehen ist. Um das Zielprotein in der Säule zu fangen, wurde eine HisTrap- Säule verwendet, das mit Nickel-Sepharose gefüllt ist, sodass das Zielprotein durch die hochspezifische His-Tag-Ni-Interaktion in der Säule gehalten wird. Imidazol ist in niedrigen Konzentrationen im Bindungspuffer sowie in hoher Konzentration im Elutionspuffer enthalten. Mit Hilfe von Imidazol wird zum einen die spezifische Bindung gefördert und zum anderen die His-Ni-Interaktion zerstört, was dazu führt, dass das gebundene Protein von der Säule gelöst wird. Das HPLC- System wird mit einem geeigneten Puffer gewaschen, sodass Verunreinigung entfernt werden können. Danach wird die Säule angeschlossen und mit Bindungspuffer äquilibriert. Als nächstes wird die Proteinlösung durch das System laufen gelassen. Mit Bindungspuffer werden zuerst Proteine ohne His-Tag aus dem System eluiert. Dann wird das Zielprotein mit dem Elutionspuffer eluiert (Cytiva 2023).

Ein Detektor misst die Absorption (mAU), also die Menge an Licht, die von der Probe absorbiert wird, bei einer spezifischen Wellenlänge (280 nm bei Protein), sodass die relative Konzentration des eluierten Proteins bestimmt werden kann.

Die Absorption über die Zeit wird von einem Chromatogramm gezeigt, wobei die Maxima des Chromatogramms einerseits verschiedenen Substanzen in der Probe entsprechen, andererseits geben die Absorptionswerte (in mAU) Aufschluss über ihre relative Konzentration.

Zuerst wurde die Reinigung des Systems durch die vier Programmschritte „*Pump wash A*“, „*Pump wash B*“, „*Washout fractionation tubing*“ und „*Column preparation*“ mit Wasser durchgeführt. Als nächstes wurde der Probenschlauch mit Wasser gespült. Danach wurde der Probenzufuhrschlauch sowie Schlauch A in den Bindungspuffer und Schlauch B in den Elutionspuffer gewechselt. Anschließend wurden die vier Reinigungsschritte „*Pump wash A*“, „*Pump wash B*“, „*Washout fractionation tubing*“ und „*Column preparation*“ mit Elutions- und Bindungspuffer wiederholt.

Eine HisTrap-Ni-Sepharose-Säule mit 1 ml Säulenvolumen wurde mit dem System verbunden und mit 5 ml Bindungspuffer äquilibriert. Die Säule wurde beladen, indem die gefilterte Proteinlösung durch das Probenröhrchen durchgelassen wurde, sodass der austretende Durchfluss in einem neuen Röhrchen gesammelt wurde. Um eine bessere Adhäsion zu erreichen, wurde der Durchfluss dreimal durch das System laufen gelassen.

Nach dem dritten Durchlauf wurden die letzten ml der Probe mit ca. 5 ml Bindungspuffer aufgefüllt und durchlaufen gelassen, um sicherzugehen, dass keine Luft in das System gerät, wenn das Röhrchen leer gesogen wird. Die Säule wurde mit 10 ml Bindungspuffer gespült und die entstehende Waschfraktion wurde in einem neuen Röhrchen gesammelt. Im Folgenden wurde das Protein mit Elutionspuffer eluiert, indem die Probe aus dem Fraktionierungsschlauch ablief. Die erste Fraktion (Eluat 1) wurde gesammelt, bis die Absorption 10 mAU überschritt. Danach wurde die zweite Fraktion (Eluat 2) mit dem Zielprotein im nächsten Röhrchen gesammelt, bis die Absorption wieder abfiel. Ab einer Absorption von unter 30-50 mAU wurde die dritte Fraktion (Eluat 3) in einem neuen Röhrchen gesammelt bis zu einem Volumen von 10 ml. Nach Abschluss der Fraktionierung wurden die Säule und das System mit 20 % Ethanol gespült.

3.3. Umpufferung und Aufkonzentrierung von XVDL und PVDL

Umpufferung und Aufkonzentrierung gehören zu den wichtigsten Schritten für die Proteinreinigung und -aufarbeitung, um das Protein nach der Elution für die Behandlung von T-Zellen in einen geeigneten Zustand zu bringen.

Nach der Elution liegt das Protein noch in Elutionspuffer vor, was für die nachfolgende Verwendung in der Zellkultur nicht optimal ist, da die Salzkonzentrationen und der pH-Wert nicht der physiologischen Zellumgebung entsprechen.

Daher wird das Protein in einen geeigneten Puffer überführt. Darüber hinaus kann das Protein dadurch aufkonzentriert werden. Der hier verwendete Elutionspuffer enthält hohe Konzentrationen an Imidazol und NaCl. Diese beiden Komponenten können T-Zellen zerstören.

Aus diesem Grund wurde die Umpufferung mittels verschiedener Methoden wie der Amicon Ultra-15 10K Zentrifugen-Filtereinheit, der PD10-Säule sowie Dialyse getestet.

3.3.1. Amicon Ultra-15 10K Zentrifugen-Filtereinheit

Die Amicon Ultra-15 10K Zentrifugen-Filtereinheit (hier als „Amicon“ bezeichnet) besteht aus einer Verschlussklappe, einer Filtereinheit und einem Zentrifugenröhrchen. Diese Methode beruht auf einer Ultrafiltrationstechnik, bei der eine semipermeable Membran dafür genutzt wird, dass Moleküle mit einer Masse größer als 10.000 Dalton in der Filtereinheit zurückgehalten werden. Die kleineren Moleküle können die Membran hingegen passieren. Die Amicon funktioniert so, dass die Proteinlösung zuerst in die obere Filtereinheit eingefüllt wird. Danach wird die Klappe verschlossen und das Röhrchen zentrifugiert, wobei das Lösungsmittel durch die Membran in die untere Kammer gedrückt wird. Das Zielprotein verbleibt in der Filtereinheit, während kleinere Moleküle sowie das Lösungsmittel passieren. Nach der Zentrifugation wird die Filtereinheit mehrmals gewaschen und die Flüssigkeit in der unteren Kammer verworfen. Durch mehrere Waschschriffe bzw. Zentrifugationsschritte kann das Volumen der oberen Kammer verringert werden, sodass das Zielprotein aufkonzentriert wird. Der umgepufferte, aufkonzentrierte Überstand, der das Zielprotein enthält, wird mithilfe von einer Pipette von der oberen Kammer entfernt (Sigma-Aldrich 2023).

Zuerst wurde die Säule vorbereitet, indem der Puffer, in dem die Amicon-Filtereinheit gelagert wurde, verworfen wurde. Als nächstes wurden 5 ml PBS auf den Filter gegeben und die Filtereinheit wurde in einem 50 ml-Reaktionsgefäß bei 2500 g für 15 min und bei 4 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Danach wurde jeweils das Eluat 2 von der XVDL- und PVDL-Aufreinigung auf den Filter gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden 5 ml PBS auf den Filter gegeben und bei 2500 g für 20 min und bei 4 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dies wurde dreimal wiederholt.

Der Überstand in der Filtereinheit, der unsere Zielproteine enthält, wurde mithilfe einer Pipette in Reaktionsgefäße überführt und für die Behandlung der Zellen eingefroren.

3.3.2. PD10 Entsalzungs-Säule

Die PD10 Säule ist eine Methode für Entsalzung, Umpufferung sowie Aufreinigung von Proteinen und anderer Biomoleküle. Die Säule besteht aus einem Gel-Filtrationsmedium. Zu Beginn wird die Säule mit einem geeigneten Puffer äquilibriert. Danach wird die Probe oben auf die Säule aufgetragen. Die Probe dringt in das Gel ein, wobei die großen Moleküle das Gel schneller passieren als die kleinen Moleküle wie Salze oder andere Pufferkomponenten. Im Anschluss wird die Säule mit einem Elutionspuffer gespült, sodass die großen Moleküle zuerst hindurchdiffundieren, gefolgt von den kleinen Molekülen. Dieses Trennungsprinzip beruht auf dem Größenunterschied der Moleküle, bei dem größere Moleküle das Gel weniger gut durchdringen und schneller durch die Säule wandern und kleinere Moleküle in die Poren des Gels eindringen und dadurch langsamer eluieren (Cytiva 2021).

Zwei Säulen wurden in zwei Reaktionsgefäße für jeweils XVDL und PVDL vorbereitet. Zunächst wurden die oberen Kappen geöffnet und das versiegelte Ende der Säule an der Unterseite aufgeschnitten. Dann wurden die Säulen mit jeweils 25 ml Elutionspuffer äquilibriert. Die Durchflüsse wurden verworfen. Darauffolgend wurden jeweils 2,5 ml der Eluate 2 der XVDL- und PVDL-Aufreinigung auf die beiden Säulen pipettiert. Erneut wurden die Durchflüsse verworfen. Die Säulen wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteine wurden mit 3,5 ml PBS eluiert. Die Eluate von XVDL und PVDL wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Hälfte des umgepufferten XVDL und PVDL wurde jeweils mit 10 % Glycerol als Gefrierschutzmittel eingefroren.

3.3.3. Dialyse-Kassette

Die Dialyse ist eine besonders nützliche Methode zum Entfernen kleiner Moleküle wie Salze, Pufferkomponenten sowie anderer Verunreinigungen.

Die Dialyse-Kassette besteht aus einer Zellulosemembran und einer hermetisch abgedichteten Probenkammer. Zuerst wird die Dialysekassette mit der Proteinlösung befüllt und verschlossen. Der gefüllte Dialysekassette wird in einem deutlich größeren Volumen eines gewünschten neuen Puffers eingetaucht. Durch die semipermeable Membran diffundieren die kleinen Moleküle aus dem Dialysebeutel in den umliegenden Puffer, während die größeren Moleküle wie das Zielprotein in der Membran zurückgehalten werden (Thermo Fisher Scientific 2023).

Zuerst wurden zwei 2 l-Bechergläser mit PBS aufgefüllt. Danach wurden die Kassetten im PBS inkubiert, um die Membranen zu hydrieren. Die Kassette wurde geöffnet und 3 ml XVDL oder PVDL wurden hinein pipettiert. Die Kassette wurde geschlossen, und die Luft wurde entfernt. Im Anschluss wurde die Kassette im PBS mittels Rührfisch und Magnetrührer gedreht und über Nacht bei 4 °C inkubiert, um die Dialyse durchzuführen. Am nächsten Tag wurden die Kassette geöffnet und die Proben in Reaktionsgefäße überführt. Die Hälfte des umgepufferten XVDL und PVDL wurde jeweils mit 10 % Gefrierschutzmittel Glycerol eingefroren.

3.4. Natriumdodecylsulfat–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Um die Expression und die Aufreinigung der rekombinanten Proteine XVDL und PVDL zu analysieren, wurde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine in einem Polyacrylamidgel einem elektrischen Feld ausgesetzt, was als Gelelektrophorese bezeichnet wird. Da Proteine unterschiedliche Eigenladungen besitzen, wird Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt, um eine gleichmäßige, negative Oberflächenladung zu erzeugen. Mithilfe der Spannung wandern die zu trennenden Proteine unabhängig von ihrer Ladung zur Anode. Um die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins zu denaturieren, werden die Proteine vor der Elektrophorese auf 95 °C erhitzt und β -Mercaptoethanol zugegeben, was die Disulfidbrücken reduziert. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard auf das Gel aufgetragen, der Proteine von bekannter Größe enthält, um die Abschätzung der Größe unbekannter Proteine zu ermöglichen (Matsumoto, Haniu, et Komori 2019).

Um dies zu erreichen, wurden 100 μ l von jeweils XVDL- oder PVDL-enthaltenden Proben in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 33 μ l 4xLämmli Puffer versetzt. Danach wurden die Proben bei 95 °C für 10 min aufgeköcht.

Für die Gelelektrophorese wurde eine Kammer vorbereitet, in die Gele mit 10 % Polyacrylamidanteil eingespannt wurden. Die Kammer wurde mit 1x Lauffuffer gefüllt. Danach wurden 4 μ l Proteinstandard und 20 μ l von jeder Probe in die Taschen pipettiert. Die Deckel wurde auf die Kammer eingesetzt und die Spannungseinheit angeschlossen. Zu Beginn wurde eine Spannung von 50 V für 15 min angelegt und danach auf 100 V hochgestellt. Der Lauf wurde nach 1-2 h gestoppt, wenn die Lauffront am unteren Bereich des Gels kurz vor dem Herauslaufen war.

3.4.1. Gelegießen

Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel ist hochprozentig und dient der effizienten Trennung der Proteine. Das niedrigprozentige Sammelgel wird für den oberen Bereich mit den Taschen verwendet, so dass die Proteine als fokussierte Lauffront auf das Trenngel treffen.

Das Trenngel und das Sammelgel wurden wie in Tabelle 8 angegeben in 50 ml vorbereitet. Zunächst wurden Acrylamid/Bisacrylamid (A/B), Tris Puffer, H₂O und SDS gemischt. Dann wurden die Glasplatten vorbereitet, die zum Gießen verwendet wurden. Zuletzt wurden APS und TEMED zugegeben, und zwar so schnell wie möglich, da diese beiden Substanzen die radikalische Polymerisation starten, durch die das Gel fest wird.

Tabelle 8: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel.

Trenngel		Sammelgel	
A/B 30% 29:1 [μ l]	2,475	A/B 30% 29:1 [ml]	650
Tris 1.0M pH 6.8 [ml]	1,875	Tris 1.5M pH 8.8 [ml]	1,875
H ₂ O [ml]	3,15	H ₂ O [ml]	3,76
SDS 20% [μ l]	37,5	SDS 20% [μ l]	25
TEMED [μ l]	10	TEMED [μ l]	7,5
APS [μ l]	37,5	APS [μ l]	38

3.5. Coomassie-Färbung

Um die nach Molekülmasse aufgetrennten Proteinen sichtbar zu machen, wurde Coomassie-Brilliant-Blau verwendet. Das Gel von XVDL und PVDL wurde für 30 min mit Coomassie-Brilliant Blau R-250 Färbelösung (*Bio-Rad Laboratories*) gefärbt und über Nacht mit Coomassie Entfärbelösung entfärbt.

Nach den ersten 30 min Entfärbung wurde die Entfärbungslösung gewechselt. Am nächsten Tag wurden Bilder der Gele mit dem *ChemiDoc MP Imaging System* aufgenommen.

3.6. Western-Blot

Um herauszufinden, ob Proteinbanden in einem SDS-Gel tatsächlich einem bestimmten Protein entsprechen, kann ein Western-Blot durchgeführt werden. Der Western-Blot beinhaltet einen Transfer-Sandwich in einer mit Puffer gefüllten Kammer, das sich aus verschiedenen gestapelten Schichten wie Schwämmen, Filterpapier, Gel und Membran zusammensetzt.

Nach der Übertragung der Proteine von Gel auf die Membran wird diese mit BSA blockiert und über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert, der an das auf der Membran fixierte Zielprotein spezifisch bindet. Nach der Übernacht-Inkubation und verschiedenen Waschschrritten wird der Sekundärantikörper zugesetzt, der den Primärantikörper erkennt und bindet. Außerdem ist der Sekundärantikörper mit einem Enzym gekoppelt, das die Detektion der Zielproteine mittels Chemilumineszenz ermöglicht. Die Banden werden sichtbar gemacht, indem das Enzym aus dem Sekundärantikörper die Oxidation eines Luminol-basierten Substrats katalysiert, wobei Licht emittiert wird.

Dafür wurde eine Kammer mit einem Rührfisch in eine Eisbox gestellt, um 4 °C während des Laufes zu temperieren. Unter dem Abzug wurde eine Schale mit 1x Transferpuffer befüllt, um das Rückgrat der Sandwiche vorzubereiten. Die PVDF-Membran wurde in einer Schale mit Methanol 1 min inkubiert, um sie für eine optimale Proteinaufnahme zu aktivieren. Für jeden Blot wurde ein Sandwich gestapelt, der von unten nach oben wie folgt aufgebaut ist: Ein Schwamm, zwei in Puffer getränkte Filterpapiere, die aktivierte Membran, das Gel, nochmal zwei in Puffer getränkte Filterpapiere, und ein Schwamm. Alles wurde zusammengestellt und in die Kammer eingespannt.

Hierbei wurde die Unterseite des Sandwich zur Anode ausgerichtet und die Oberseite zur Kathode, damit die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Oberseite der Membran transferiert werden. Die Kammer wurde mit 1 x Transferpuffer gefüllt und mit der Eisbox auf einen Magnetrührer gestellt, um den Puffer mit dem Rührfisch zu durchmischen, was eine gleichmäßige Temperatur in der gesamten Kammer gewährleistet. Die Spannungseinheit wurde auf 100 V für 75 min eingestellt.

Nach den 75 min wurde die Kammer und die Blot-Sandwiches aufgemacht. Die Membran wurde in vorbereitete 50 ml Reaktionsgefäße mit 5 ml Blockierlösung (3 % BSA/TBS-T) geschoben und 1 h bei Raumtemperatur (RT) gerollt. Anschließend wurden die Membranen in Röhrchen mit 5 ml Primärantikörper spezifisch für den His-Tag (1:1000 in 3 % BSA/TBS-T) überführt und über Nacht bei 4 °C rollen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Membranen in Schalen mit TBS-T überführt und 10 min geschwenkt. Danach wurde der Puffer abgeschüttet und frischer Puffer erneut appliziert. Dies wurde dreimal wiederholt.

Danach wurde das TBS-T abgeschüttet und 10 ml Sekundärantikörper spezifisch für Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt (1:10,000 in TBS-T) dazugegeben. Daraufhin wurde 1 h geschwenkt. Nach 1 h wurde der Sekundärantikörper abgeschüttet und die Schale mit 10 ml TBS-T aufgefüllt. Dies wurde 10 min rollen gelassen. Anschließend wurde das TBS-T abgeschüttet und 10 ml TBS dazugegeben. Es wurde 10 min geschwenkt. Dies wurde zwei Mal wiederholt.

Im Anschluss daran wurde das *ChemiDoc MP Imaging System* eingeschaltet. Für das Entwickeln wurde das Substrat (*ECL Select Western Blotting Detection Reagent*) nach Herstellerangaben vorbereitet, indem Luminol- und Peroxidlösung im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. 400 µl Substrat wurde auf jede Membran getropft und zwischen zwei Lagen Plastikfolie gründlich auf der gesamten Membran verteilt.

Danach wurde das Gel auf eine Folie gelegt und am *Imaging System* belichtet, bis ein starkes Signal beobachtet wurde, und die Chemilumineszenz aufgenommen. Dies waren für den His-Tag-Antikörper 60 s. Ebenso wurde ein normales Foto für den Proteinstandard-Marker aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder wurden mit *Imagelab* und *PowerPoint* am PC ausgewertet.

3.7. Protein-Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von XVDL und PVDL zu bestimmen, wurden folgende Assays durchgeführt.

3.7.1. Bichinoninsäure (BCA) Assay

Das Bichinoninsäure (BCA)-Reagenz interagiert mit Peptidbindungen, wobei sich ein farbiger Komplex bildet. Je höher die Absorption bei 562 nm ist, desto höher ist die Proteinkonzentration in einer Lösung.

Um eine unbekannte Konzentration zu bestimmen, kann eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) genutzt werden. Mittels linearer Regression kann dann die Steigung der Standardkurve bestimmt und dadurch auf die unbekannte Proteinkonzentration geschlossen werden.

Für den BCA-Assay wurde das *Kit Pierce™ BCA Protein Assay* von Thermo Scientific™ verwendet. Zuerst wurden die Standards A-I nach Herstellerangaben im Bereich von 0,025 bis 2,000 µg/µl in PBS erstellt.

Des Weiteren wurden 10 µl von jedem Standard und jeder Probe in Duplikaten in die Vertiefungen einer 96-well-Platte mit flachem Boden pipettiert. Danach wurde BCA-Reagenz aus den Reagenzien A und B des Kits im Verhältnis 50:1 A: B hergestellt und 200 µl von dem BCA-Reagenz in jede Vertiefung pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert und durch einen Mikroplatten-Reader, den *Spark® Multimode-Mikroplatten-Reader*, wurde die Absorption bei 562 nm gemessen.

Die gemessene Absorption wurde gegen die Proteinkonzentrationen der Standards aufgetragen. Mittels linearer Regression wurden die Parameter der Standardgerade $y = m \cdot x + b$ bestimmt. Durch Umstellen der Geradengleichung nach x konnte die unbekannte Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

3.7.2. Bradford Assay

Das Bradford-Reagenz beruht auf der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau an Proteine, sodass die Farbe von braun/rot nach blau verändert wird, wenn die Proteinkonzentration zunimmt. Bei der Anwendung des Bradford Assays wird typischerweise die Absorption des Proteins bei den zwei verschiedenen Wellenlängen 595 nm und 465 nm gemessen.

Durch das Verhältnis der Absorption (595/465) wird erreicht, dass die unspezifische Absorption herausgerechnet wird, sodass die Messgenauigkeit weniger durch Störfaktoren beeinträchtigt wird. Auf diese Weise beruht die gemessene Absorption hauptsächlich auf der Bindung des Farbstoffs an die Proteine.

Zuerst wurden Standards A-I im Bereich von 0,025 bis 2,000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ äquivalent zu den Standards im BCA Assay erstellt. Daraufhin wurden 10 μl von jedem Standard und jeder Probe XVDL und PVDL in Duplikaten in die Vertiefungen einer 96-*well*-Platte mit flachem Boden pipettiert. Als nächstes wurde 300 μl Bradford Reagenz zu jeder Vertiefung hinzugegeben.

Daraufhin wurde die Platte für 30 s geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm und 465 nm gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen 595 nm/465 nm wurde gegen die Proteinkonzentrationen der Standards aufgetragen. Mittels linearer Regression wurden die Parameter der Standardgerade $y = m \cdot x + b$ bestimmt. Durch Umstellen der Geradengleichung nach x konnte die unbekannte Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

3.8. CD4+ T-Zell-Isolation aus Milzen

Um T-Zell-Effektorfunktionen untersuchen zu können, wurden primäre, murine T-Zellen aus Mäuse-Milzen isoliert und in der Zellkultur kultiviert und stimuliert. Dafür wurden Milzen von Wildtyp-Mäusen mit einem C57BL/6J Hintergrund im Alter von 12-20 Wochen verwendet. Frische Milzen wurden von der Arbeitsgruppe bereitgestellt.

Das Prinzip der Isolation (siehe Abbildung 6) beruht auf den Verfahren des *magnetic activated cell sortings* (MACS). Der spezifische CD4-PE Antikörper bindet CD4+ T-Zellen. Als nächstes heften sich PE-*Microbeads* an die Antikörper. Eine LS-Säule (Miltenyi Biotec) wird in einen Magneten gespannt. Wenn die Zellsuspension durch die Säule läuft, werden die mit *Microbeads* markierten Zellen durch den Magneten festgehalten. Die restlichen, nicht markierten Zellen laufen ungehindert durch die Säule durch. Die verbleibenden CD4+ Zellen können außerhalb des Magnetfelds aus der Säule gespült werden.

Zuerst wurde die Milz aus einer Maus präpariert. Danach wurde ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße auf ein 50 ml Reaktionsgefäß aufgesetzt und mit PBS befeuchtet, um es vorzubereiten. Die Milz wurde durch das Zellsieb mit der Rückseite einer 1 ml Spritze gedrückt und dabei mehrmals mit PBS gespült. Die Zellsuspension wurde bei 450 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet in 3 ml *Red blood cell* (RBC) Lyse Puffer resuspendiert und 3,5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 ml PBS-Puffer hinzugefügt und es wurde mit 500 g für 6 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Unter einer sterilen Werkbank wurde das Pellet in 2 ml MACS (MACS)-Puffer resuspendiert. Danach wurden 10 µl α-CD4-PE-Antikörper dazugegeben, um CD4+ T-Zellen zu markieren. Nach einer Inkubation bei 4 °C für 15 min wurde die Zellsuspension mit 500 g für 6 min bei RT zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 900 µl MACS-Puffer resuspendiert und es wurden 100 µl α-PE-*Microbeads* hinzugegeben. Dann wurde die Zellsuspension bei 4 °C für 15 min inkubiert und anschließend bei 500 g 6 min RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml MACS-Puffer resuspendiert und bei 500 g für 6 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Als nächstes wurde eine LS-Säule (Miltenyi Biotec) eluiert. Die Säule wurde in einen Magneten eingespannt und ein 15 ml Reaktionsgefäß unter die Säule gestellt. Danach wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer eluiert. Nachdem die 3 ml MACS-Puffer eingelaufen waren, wurde die in 1 ml MACS-Puffer resuspendierte Probe auf die Säule gegeben. Nachdem die 1 ml Probe eingelaufen war, wurden 3 ml MACS-Puffer zugegeben, um die Säule zu spülen.

Anschließend wurde die Säule aus dem Magnet entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf die Säule wurden 5 ml MACS-Puffer gegeben und die Flüssigkeit wurde mit einer Spritzenrückseite durchgedrückt. Die resultierende Fraktion im Reaktionsgefäß enthielt CD4+ T-Zellen, welche mit 500 g für 6 min bei RT zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS oder T-Zell-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt.

3.9. Zellen zählen

Zunächst wurde eine Vorverdünnung 1:10 mit 0,4 % Trypan Blau, d.h. 90 µl Trypan Blau und 10 µl Zellsuspension, vorbereitet. Danach wurde die Vorverdünnung 1:5, d.h. 40 µl Trypan Blau mit 10 µl Zellsuspension verdünnt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit 10 µl von der Verdünnung beladen. Unter einem Mikroskop wurden die Zellen von vier Quadranten gezählt.

Diese Anzahl wurde durch vier geteilt und die verwendete Verdünnung mitberechnet, um auf die Konzentration der isolierten Zellen zu schließen. Die Anzahl N an Zellen pro Quadranten entspricht hierbei einer Konzentration von $N \cdot 10^4$ Zellen/ml.

3.10. Stimulation von T-Zellen für Proliferationsanalyse

Damit T-Zellen zur Proliferation angeregt werden und in einem Proliferationsassay analysiert werden können, können sie mit Antikörpern spezifisch für CD3 und CD28 stimuliert werden. Diese interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex und sorgen für eine Signalweiterleitung innerhalb der Zelle, die u.a. zu Proliferation führt.

Für die Stimulation werden Zellkulturplatten mit diesen Antikörpern beschichtet, bevor Zellen darauf ausgesät werden.

Ein Mastermix wurde für das Beschichten der Platte je nach Anzahl der Proben unter einer Sterilwerkbank vorbereitet. In PBS wurden 5 µg/ml α -CD3 und 1 µg/ml α -CD28 angesetzt.

Anschließend wurden 300 µl pro *well* in eine 24-*well*-Platte pipettiert und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Vor der Aussaat von Zellen wurden die beschichteten *wells* 2x mit PBS gespült. Nach Aussaat von Zellen auf beschichtete Platten und Behandlung dieser wurden die Zellen für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, bevor die Proliferation analysiert werden konnte.

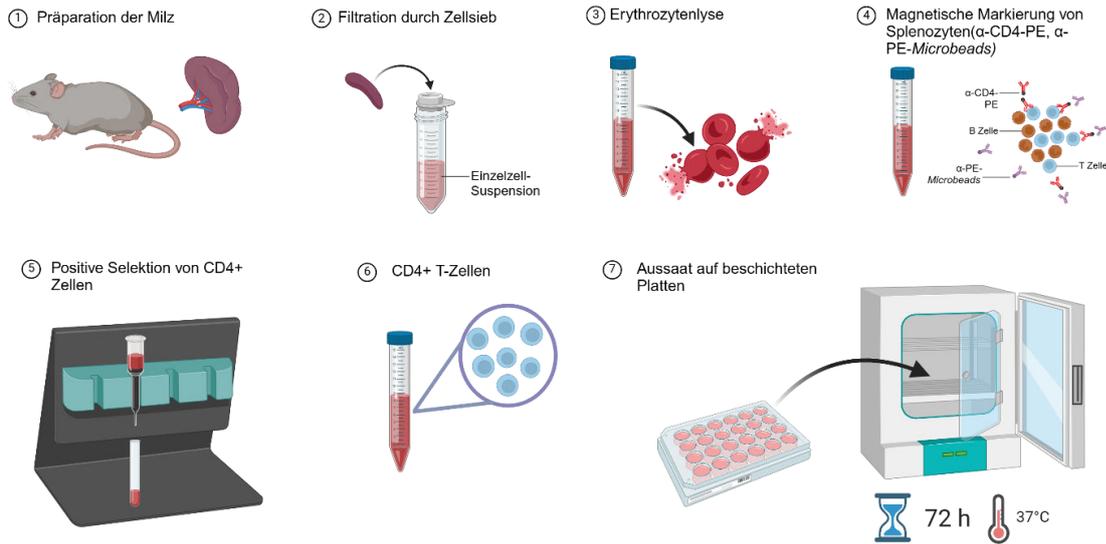


Abbildung 6: CD4+ T-Zell-Isolation (erstellt mit BioRender).

Die Isolation von CD4+ T-Zellen startet mit der Präparation der Milz aus einer Maus (1). Danach wurde die Milz durch ein Zellsieb gedrückt (2), um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Durch Zugabe von RBC-Lyse-Puffer (3) wurden die Erythrozyten lysiert. Nach mehrere Zentrifugationsritten wurde die magnetische Markierung von Splenozyten durch Zugabe von α -CD4-PE und α -PE-Microbeads durchgeführt (4). Mithilfe eines Magneten, in den eine Säule eingespannt wurde, fand die positive Selektion von CD4+ Zellen statt (5). Anschließend wurden die CD4+ T-Zellen (6) ausplattiert, behandelt sowie für 72 h bei 37 °C inkubiert (7).

3.11. Proliferationsanalysen

3.11.1. Carboxyfluorescein-Succinimidylester Färbung (CFSE-Färbung)

Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) ist ein membranpermeabler, fluoreszenzbasierter Farbstoff zur Verfolgung der Lymphozytenteilung, indem CFSE kovalent langlebige intrazelluläre Moleküle mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Carboxyfluorescein* markiert (Parish 1999). CFSE besteht aus lipophilen Molekülen, was dazu führt, dass diese leicht in die Zellen eindringen, da sie Membranen passieren können. Nach dem Eindringen in die Zelle binden CFSE-Moleküle kovalent an die primären Amine von Proteinen und bleiben dort dauerhaft fixiert. Dies ermöglicht, dass die markierten Zellen über mehrere Zellteilungen hinweg verfolgt werden können. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zur Hälfte verdünnt. Da die Anzahl der Zellteilungen durch die Fluoreszenzintensität von CFSE bestimmt werden kann, wird CFSE für die Proliferationsanalyse in der Durchflusszytometrie verwendet (Quah et Parish 2010).

Für eine Proliferationsanalyse mit CFSE müssen die T-Zellen vor der Aussaat gefärbt werden. Nach der Zählung der Zellen wurde ein Mastermix hergestellt. 1 Mio. Zellen pro Ansatz wurden in 1 ml PBS resuspendiert. Zusätzlich wurden 1:4,000 5 mM CFSE hinzugefügt. Die Ansätze wurden für 20 min bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde zur Suspension 1 ml fötales Kälberserum (FCS) pro 1 ml PBS zugegeben und erneut für 5 min bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation bei 450 g für 6 min und RT.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml T-Zell-Medium pro 1 Mio. Zellen resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension pro *well* auf der mit α -CD3 und α -CD28 beschichteten 24-*well*-Platte ausgesät.

3.11.2. Ki67 Färbung

Um eine höhere Überlebensrate der Zellen zu gewährleisten, wurde statt CFSE der Marker Ki67 genutzt, um Proliferation von Zellen zu analysieren. Hierbei handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, welches nach 72 h Stimulation mit einem fluoreszenz-gekoppelten Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Daher muss hier vor der Aussaat keine Färbung vorgenommen werden.

Nach der Zählung der Zellen wurde ein Mastermix aus der gezählten Zellsuspension und T-Zell-Medium erstellt. Anschließend wurden 1 Mio. Zellen in 1 ml T-Zell-Medium pro *well* auf eine beschichtete 24-*well*-Platte pipettiert.

3.11.3. Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden nach der Aussaat auf die Platten in Duplikaten mit zwei verschiedenen Konzentrationen von XVDL und PVDL behandelt (2 µg/ml und 20 µg/ml). Außerdem wurden die Proben mit zwei verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, Xpr1-spezifischen Antikörpers 2G8 und einem α-IgG1κ-Antikörper behandelt (1 µg/ml, 10 µg/ml).

Dazu gab es zwei unbehandelte und ungefärbte Proben für Kontrollen bei der durchflusszytometrischen Färbung nach 72 h Inkubation.

3.12. Durchflusszytometrie (FACS)

Durchflusszytometrie, auch als FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) bezeichnet, ist eine Methode, die nicht nur die Analyse von Zellen ermöglicht, sondern auch eine Zellsortierung nach ihren Eigenschaften.

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Systemen: Fluidik, Optik und Elektronik. Das Fluidiksystem leitet die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine feine Düse. Das Optiksysteem ist aus Lasern zusammengesetzt. Die Zellen werden nach hydrodynamischer Fokussierung durch den Laserstrahl einzeln durchgeführt und das Laserlicht interagiert mit den Zellen. Hierbei wird Lichtstreuung in verschiedene Richtungen gemessen, was morphologische Information über die Größe und innere Komplexität bzw. Granularität der Zellen enthält. Außerdem kann Fluoreszenzintensität in verschiedenen Kanälen gemessen werden, wenn Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert wurden. Hierbei werden Fluorophore vom Laserlicht angeregt, woraufhin Licht in einer anderen Wellenlänge emittiert wird. *Forward Scatter* (FSC) und *Side Scatter* (SSC) sind zwei Parameter, die physikalische Eigenschaften von Zellen beschreiben. Der FSC-Detektor ist für die Messung des gestreuten Lichts im 180°-Winkel zuständig und gibt Aufschluss über die Zellgröße, da größere Zellen mehr Licht nach vorne streuen und ein höheres FSC-Signal aufweisen (Givan 2001).

Im SSC-Detektor wird Licht im 90°-Winkel gemessen, was Informationen über die innere Komplexität bzw. Granularität enthält, da komplexere Zellen z.B. mit vielen Granula mehr Licht streuen. Die Durchflusszytometrie ist eine äußerst effiziente Technik, mit der eine sehr große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit analysiert werden kann (Givan 2001).

Nach 72 h in Kultur wurden die Zellen aus der Platte ab gespült, in Reaktionsgefäße überführt und bei 500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Zellpellets wurden in 200 µl PBS resuspendiert und in die Vertiefungen einer 96-well-Platte mit konischem Boden überführt.

Danach wurden die Proben zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und dabei für jeweils 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert wurde. Der extrazelluläre Antikörper wurde als Mastermix vorbereitet. Für eine Probe bestand er aus 0,05 µl ZombieViolet-Pacific Blue, 0,1 µl CD4-PE, 0,1 µl FcR-Block und 19,75 µl PBS. Anschließend wurden 20 µl dieses Mixes pro *well* pipettiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde erneut jede Probe mit 200 µl PBS zweimal gewaschen, analog zum oben beschriebenen Waschprozess.

Nach der letzten Zentrifugation wurde jede Probe in 50 µl Fixierungslösung resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde jede Probe zweimal mit 200 µl Permeabilisierungspuffer gewaschen.

Der intrazelluläre Ki67-Antikörper wurde als Mastermix vorbereitet. Für eine Probe bestand dieser aus 0,4 µl Ki67-PE-Vio770 und 19,6 µl Permeabilisierungspuffer.

Anschließend wurde jede Probe in 20 µl dieses Mastermixes resuspendiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde jede Probe zweimal mit 200 µl Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Proben wurden in 150 µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen für die Messung überführt. Bei der FACS-Analyse wurden Einzelfärbungen zuerst durchgeführt, um Detektorspannungen optimal für jeden verwendeten Kanal einstellen zu können. Jede Einzelfärbung wurde mit einem spezifischen Fluorophor-konjugierten Antikörper gefärbt und bindet an ein bestimmtes Antigen auf der Zelloberfläche oder Zellinneren. Für die Messung wurde das Gerät *Cantoll von BD-Bio Sciences* eingesetzt, das drei Laser mit den Wellenlängen 407 nm, 488 nm und 633 nm, und eine Kombination aus *Longpass*-Spiegeln und Breitbandfiltern besitzt.

Das Gerät wurde mit einer *Flow Rate* von 1000-3000 Events/s genutzt und die Fluoreszenz-Kanäle PE-A, PE-Cy7-A sowie *Pacific Blue-A* wurden aufgenommen. Es wurde eine CFSE-Färbung durchgeführt, wurde außerdem das Signal für FITC-A aufgenommen. Pro Probe wurden 30000 Zielevents aufgenommen, wenn genug Zellen vorhanden waren. Kompensation und Auswertung wurden mit *FlowJo 10.10.0* durchgeführt.

3.13. Gating Strategie

Die aufgenommenen Events wurden durch eine Gatingstrategie (siehe Abbildung 7) analysiert, bei der zunächst der Bereich in einem SSC-A/FSC-A-Diagramm ausgewählt wurden, in dem T-Lymphozyten zu erwarten sind. Anschließend wurden Dupletten in einem FSC-H/FSC-A-Diagramm diskriminiert. Der Farbstoff ZombieViolet im Kanal *Pacific Blue-A* wurde genutzt, um tote Zellen zu markieren. CD4 im PE-A-Kanal wurde für die Markierung von CD4+ T-Zellen genutzt. Im Pacific Blue-A/PE-A-Diagramm wurde das Gate für lebende CD4+ T-Zellen ausgewählt. Anschließend wurden Ki67+ Zellen im PE/Cy7-A-Histogramm ausgewählt.

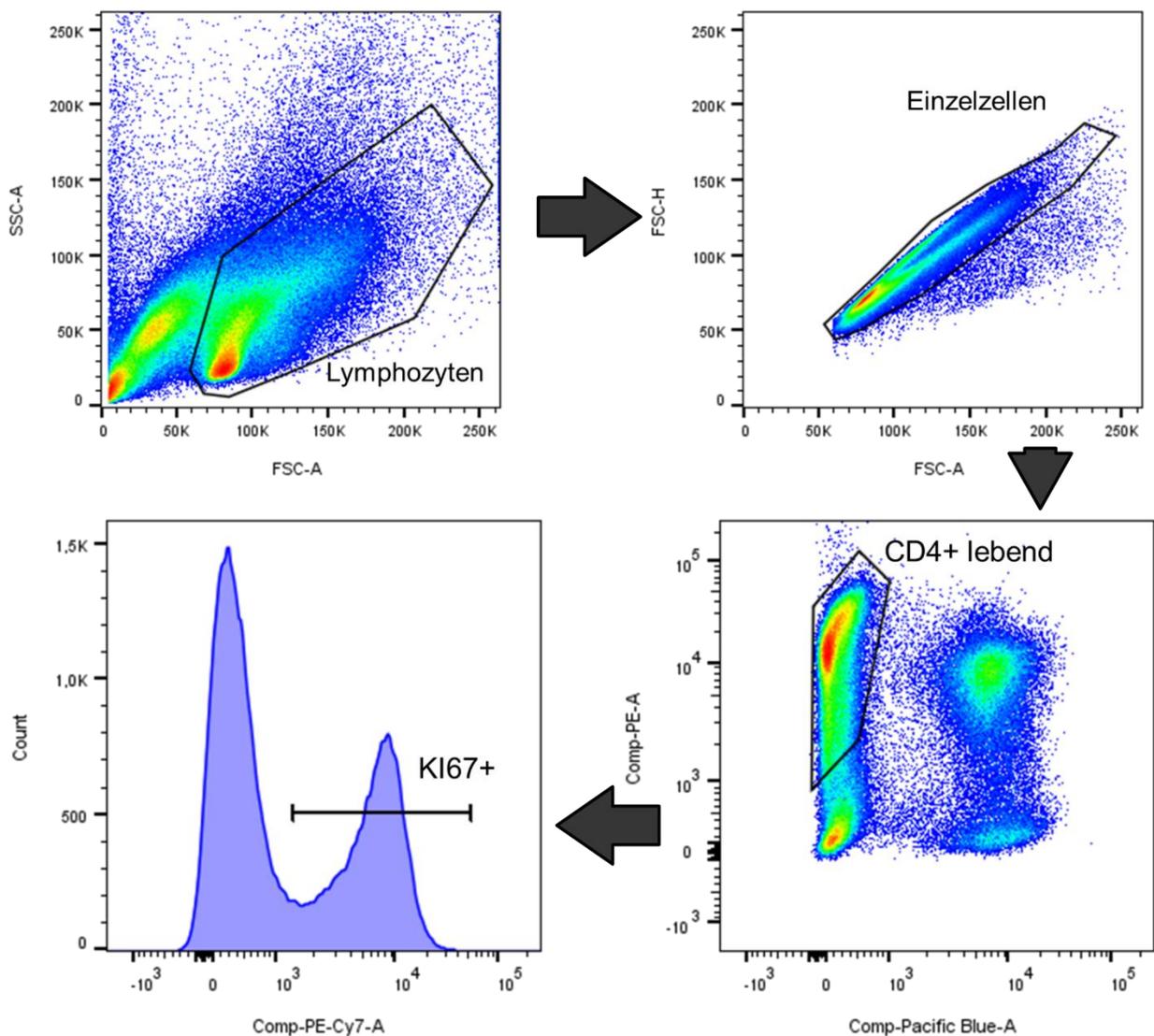


Abbildung 7: Gating Strategie für Proliferationsanalyse.

Zunächst wurden die Lymphozyten im Bereich SSC-A/FSC-A ausgewählt. Daraufhin wurden die Einzelzellen im FSC-H/FSC-A-Plot selektiert. Als nächstes erfolgte die Unterscheidung zwischen CD4-positiven und -negativen Zellen sowie zwischen lebenden und toten Zellen durch CD4-PE und den Viabilitäts-Marker ZombieViolet-Pacific Blue. Es wurden die lebenden CD4+ Zellen ausgewählt. Zum Schluss wurden die Ki67+ Zellen mithilfe des Histogramms bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Aufreinigung der Proteine mittels HPLC

Um in dieser Arbeit die Auswirkungen auf die Proliferation von T-Zellen durch eine Modulation von XPR1 zu untersuchen, wurden zuerst XVDL- und PVDL-Proteine hergestellt. In Abbildung 8 ist ein exemplarischer Verlauf der Proteinaufreinigung von XVDL dargestellt. Nachdem die Säule angeschlossen und mit Bindungspuffer äquilibriert wurde, wurde als nächstes das Bakterienlysate, in welchem das Protein (XVDL) exprimiert wurde, auf die Probensäule bei 0 ml gegeben. Dies führt zu einer Steigung der Absorption auf etwa 720 mAU. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Um die Adhäsion zu verbessern, wurde das Bakterienlysate mehrmals über die Säule laufen gelassen, was eine konstante Absorption von 660 mAU zur Folge hatte. Danach wurde die Säule mit 10 ml Bindungspuffer ab 104 ml gewaschen, was dazu führte, dass die Absorption auf 0 mAU abfiel. Im Anschluss wurde der Elutionspuffer auf die Säule gegeben, dann fiel die Absorption ab. Danach steigt die Absorption wieder auf bis zu 550 mAU, was einem großen XVDL-Proteinpeak ab 117 ml entspricht. Schließlich fällt die Absorption wieder, da nun alle Proteine eluiert wurden.

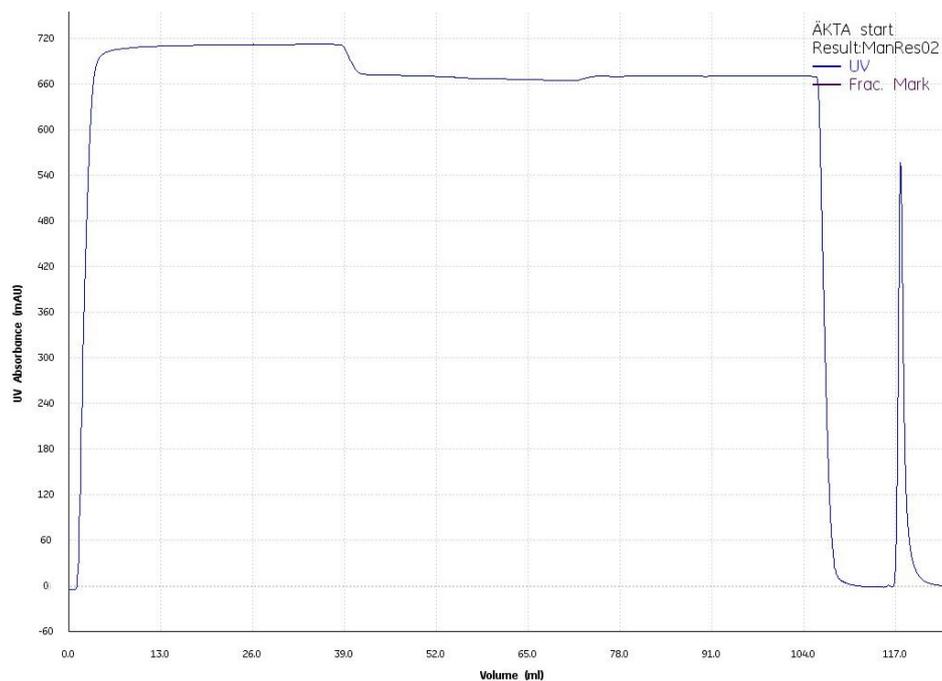


Abbildung 8: Exemplarischer Verlauf der Proteinaufreinigung von XVDL.

Nach der Transformation und Expression wurden die Proteine XVDL und PVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem Großteil des Peaks entspricht.

Nach der Aufreinigung wurden die Proteine mit verschiedenen Methoden umgepuffert und aufkonzentriert. Um die Transformation und Expression von XVDL und PVDL nach der Aufreinigung zu bestätigen, wurden die dreimal mittels HPLC aufgereinigten Proteine analysiert.

4.2. Umpufferung

4.2.1. Amicon

Um die Proteine zu analysieren, wurden verschiedene Proben mit einer SDS-Page aufgetrennt und mit Comassie Brilliant Blau angefärbt, wie in den Abbildungen 9 und 11 dargestellt. Zuerst wurden die Proteine mit einer Amicon-Säule umgepuffert. In Abbildung 9 sind verschiedene Banden im Bakterienlysat vor IPTG-Induktion zu sehen. Dies entspricht den verschiedenen Proteinen in der Proteinlösung. IPTG wird als Induktor für die Proteinexpression verwendet und induziert die Expression des lac-Operons, wodurch die Produktion der Zielproteine ermöglicht wird. Nach Zugabe von IPTG ist eine intensivere Bande zwischen 35 und 25 kDa im Bakterienlysat zu sehen, was auf die Produktion des Zielproteins PVDL hindeutet. Im Durchfluss ist genau diese Bande nicht mehr sichtbar. Stattdessen sind viele Banden von Proteinen zu sehen, die nicht an der Säule gebunden waren. In der Waschfraktion und Fraktion 1 sind fast keine Banden zu sehen, was zeigt, dass das Protein noch gut in der Säule gebunden war. In Fraktion 2, wie aufgrund des Peaks bei circa 115 ml von Abbildung 10 zu erwarten, ist eine intensive Bande zwischen 25 und 35 kDa zu sehen, was PVDL entspricht. In Fraktion 3 ist eine schwache Bande zu erkennen, was vermuten lässt, dass etwas PVDL auch in dieser Fraktion vorhanden ist. Schließlich ist eine intensive Bande nach der Umpufferung mit Amicon detektierbar.

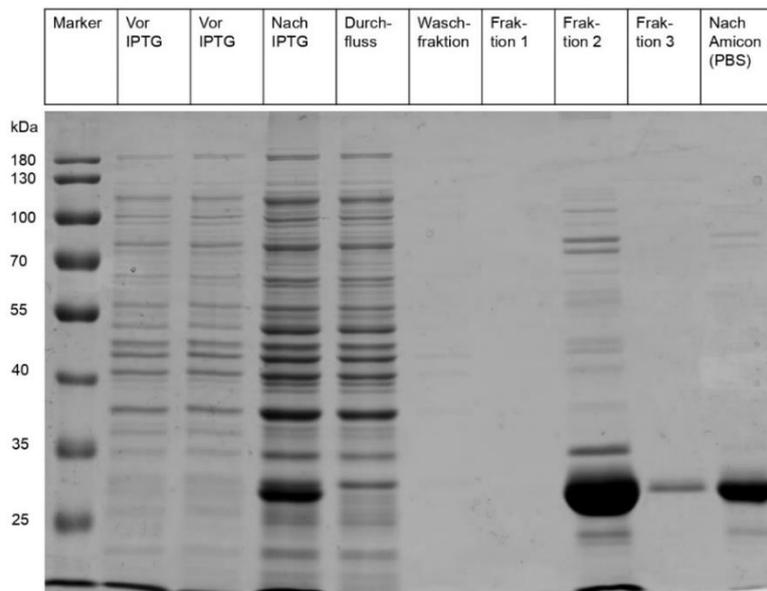


Abbildung 9: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (PVDL).

Nach der Aufreinigung des PVDL-Proteins wurde mit Amicon umgepuffert und eine SDS-PAGE durchgeführt sowie mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben. Vor IPTG stellt das Bakterienlysats vor Zugabe von IPTG dar. Nach IPTG repräsentiert das Bakterienlysats nach 4h IPTG-Induktion. Der Durchfluss entspricht dem Rest des Bakterienlysats, was nicht an der Säule gebunden hat. Die Waschfraktion entspricht dem Waschen der Säule mit Bindungspuffer. Fraktion 1 zeigt das erste Eluat, das nach Zugabe des Elutionspuffers gesammelt wird. Fraktion 2 ist das Zielprotein PVDL. Fraktion 3 ist das dritte Eluat. „Nach Amicon“ zeigt die Proteinlösung nach der Umpufferung mittels Amicon-Säule.

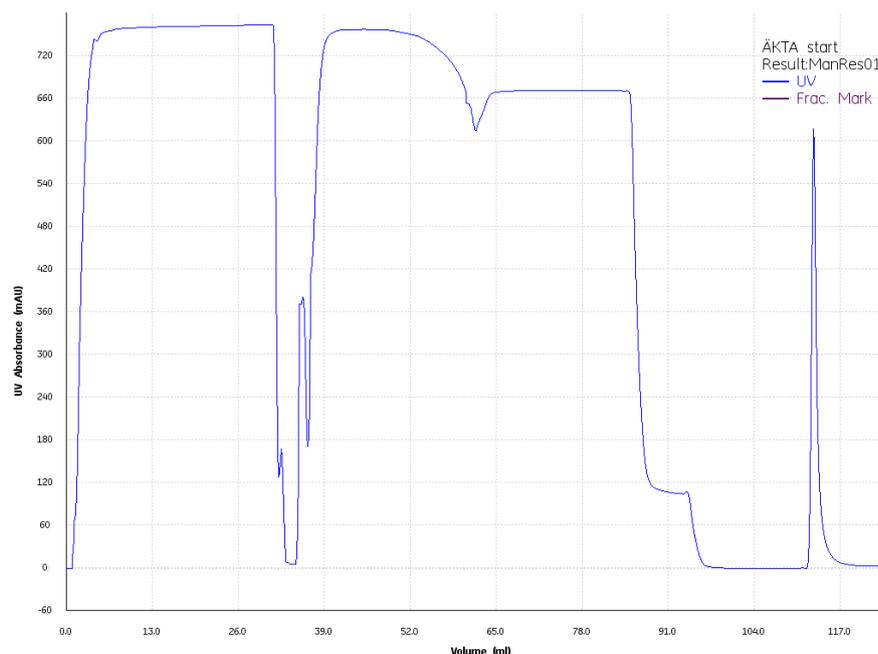


Abbildung 10: Verlauf der Aufreinigung von PVDL.

Nach der Transformation und Expression wurde das Protein PVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem Großteil des Peaks entspricht.

In Abbildung 11 ist die Analyse der Proteinisolierung von XVDL zu sehen. Vor der Zugabe von IPTG sind mehrere Proteinbanden sichtbar. Nachdem IPTG zugegeben wurde, ist zusätzlich eine intensive Bande zwischen 25 kDa und 35 kDa erkennbar, was XVDL entspricht. Im Durchfluss sind ebenfalls viele Banden zu sehen, welche nicht an der Säule gebundenen Proteinen entsprechen. In der Waschfraktion ist eine schwache Bande zwischen 25 kDa und 35 kDa zu erkennen, sodass vermutlich nicht alles XVDL an der Säule gebunden wurde und in der Waschfraktion verloren gegangen ist. Dies wird auch in Abbildung 12 bestätigt, da ein großer Peak zwischen bei etwa 83 ml bei dem Waschschrift von XVDL zu erkennen ist. Wie zu erwarten ist in Fraktion 1 keine Bande zu erkennen.

In Fraktion 2 ist eine intensive Bande sichtbar, was XVDL entspricht. In Fraktion 3 ist ebenfalls eine schwache Bande erkennbar, was darauf hindeutet, dass das Protein minimal bei Fraktion 3 verloren gegangen ist. Zum Schluss ist nur eine dünne Bande nach Amicon-Umpufferung erkennbar. Es wird daher vermutet, dass das ein Großteil des Proteins nach der Umpufferung ausgefallen ist.

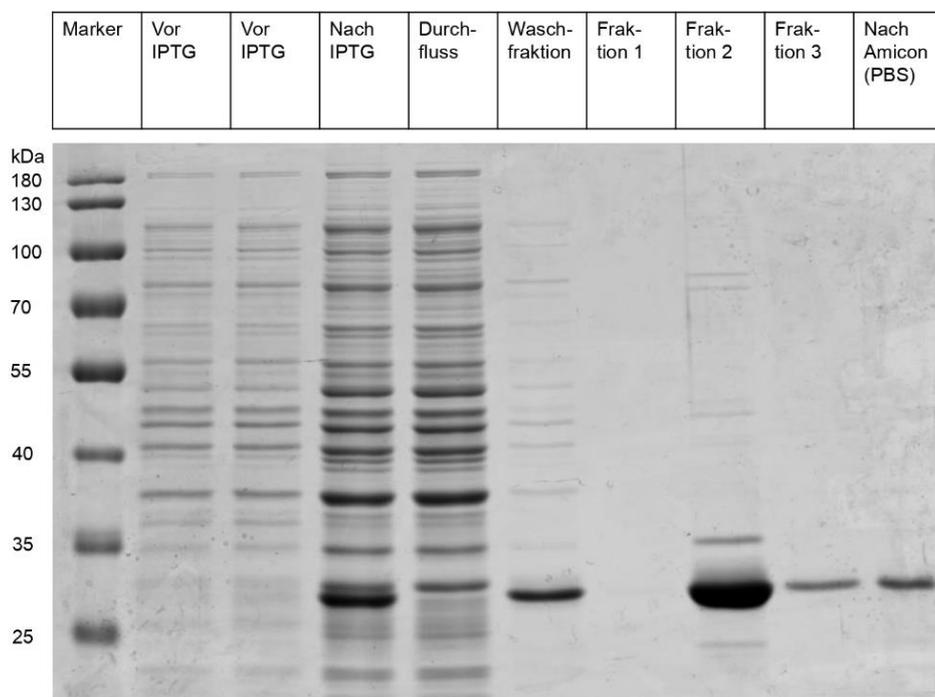


Abbildung 11: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (XVDL).

Nach der Aufreinigung des XVDL-Proteins wurde mit Amicon umgepuffert und eine SDS-PAGE durchgeführt sowie mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben. Vor IPTG stellt das Bakterienlysats vor Zugabe von IPTG dar. Nach IPTG repräsentiert das Bakterienlysats nach 4h IPTG-Induktion. Der Durchfluss entspricht dem Rest des Bakterienlysats, was nicht an der Säule gebunden hat. Die Waschfraktion entspricht dem Waschen der Säule mit Bindungspuffer. Fraktion 1 zeigt das erste Eluat, das nach Zugabe des Elutionspuffers gesammelt wird. Fraktion 2 ist das Zielprotein XVDL. Fraktion 3 ist das dritte Eluat. „Nach Amicon“ zeigt die Proteinlösung nach der Umpufferung mittels Amicon-Säule.

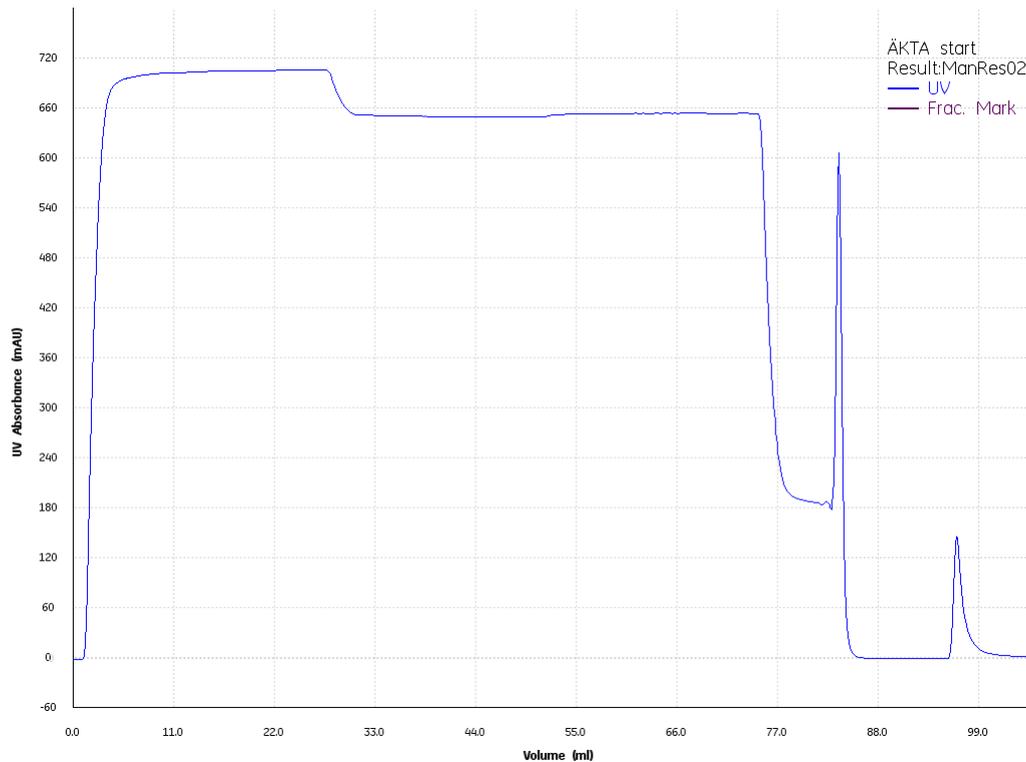


Abbildung 12: Verlauf der Aufreinigung von XVDL.

Nach der Transformation und Expression wurde das Protein XVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem kleinen Peak entspricht.

Nach der Umpufferung mit der Amicon-Filtereinheit wurde für beide Proteine weißes Präzipitat in der Proteinlösung aufgefunden, was darauf hindeutet, dass PVDL und XVDL ausgefallen sind. Um dies zu überprüfen, wurde das Präzipitat abzentrifugiert und anschließend der Überstand und die Pellets nach der Zentrifugation mit Coomassie-Gelen analysiert. Abbildung 13 zeigt, dass insbesondere PVDL ausgefallen ist, da hier eine intensive Bande im Pellet zwischen 35 und 25 kDa zu sehen ist. Im Gegensatz dazu wurde eine dünnere, nicht so intensive Bande im Pellet von XVDL detektiert, sodass vermutlich viel Protein bereits in der Waschfraktion verloren gegangen ist. Darüber hinaus ist in den Überständen zu beobachten, dass bei PVDL eine intensive dünne Bande und bei XVDL eine sehr schwache Bande sichtbar ist. Ebenso wurde die Proteinkonzentration im Überstand mit der Bradford-Methode bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung ergab, dass PVDL eine Konzentration von 0,113 µg/ml aufweist, während die Konzentration von XVDL 0,001 µg/ml beträgt. Die gemessenen Konzentrationen sind zu niedrig und daher nicht für die Behandlung der T-Zellen geeignet.

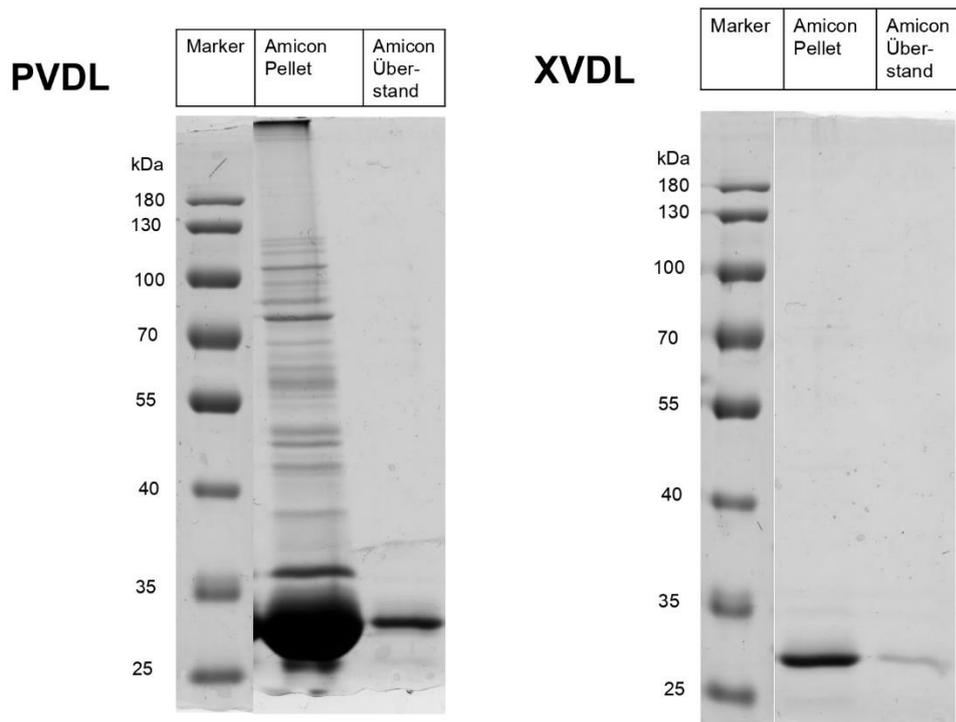


Abbildung 13: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel von Überstand und Pellet nach Umpufferung mit Amicon.

Nachdem die XVDL- und PVDL- Proteine mittels Amicon umpufferung wurde, wurde Präzipitat detektiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand und das Pellet wurden auf dem Gel aufgetragen. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben.

4.2.2. Western-Blot

Die Western-Blots mit einem His-Tag-Antikörper ermöglichen die spezifische Detektion von His-Tag-markierten Proteinen. Dadurch soll ermittelt werden, ob die in den Coomassie-Gelen gezeigte intensive Bande zwischen 25 und 35 kDa tatsächlich den Zielproteinen XVDL und PVDL entspricht.

In Abbildung 14 sind Western-Blots gezeigt, die den Coomassie-Gelen von Abbildungen 9 und 11 entsprechen. Vor Zugabe von IPTG ist keine Bande zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die mit einem His-Tag versehenen Proteine noch nicht exprimiert sind. Nach der IPTG-Zugabe ist jeweils eine intensive dünne Bande bei PVDL sowie bei XVDL detektierbar, was darauf hinweist, dass die Zielproteine PVDL sowie XVDL nach der Induktion stark exprimiert wurden. Im Durchfluss sowie in Fraktion 1 bei beiden Proteinen sind keine Banden ersichtlich, was auf eine effektive Bindung der Zielproteine an der Säule hindeutet. In der Waschfraktion ist bei PVDL keine Bande zu sehen, während bei XVDL eine dünne Bande gezeigt wurde. Damit wird bestätigt, dass XVDL in der Waschfraktion zurückgeblieben ist.

Die Western-Blots der Proteine verdeutlichen eine erfolgreiche Transformation und Expression von XVDL und PVDL durch Fraktion 2, in der jeweils die spezifische Bande erkennbar ist. Die Banden treten zwischen 35 und 25 kDa auf, was dem erwarteten Molekulargewicht von XVDL und PVDL entspricht. In der Fraktion 3 ist eine schwächere Bande sichtbar und wird vermutet, dass eine kleine Menge an PVDL sowie XVDL enthalten ist. Nachdem die Proteine mit der Amicon-Säule umgepuffert wurden, ist bei PVDL eine intensive Bande bei etwa 30 kDa erkennbar, was zeigt, dass das PVDL nach dem Pufferwechseln und nach der Konzentrierung vorhanden ist. Bei XVDL ist eine deutlich schwächere Bande sichtbar, was darauf hinweist, dass XVDL auch vorhanden ist, nur in geringerer Menge.

Zusammenfassend zeigen die Western-Blots, dass es sich bei der intensiven Bande zwischen 25 und 35 kDa, die in Coomassie-Gelen detektiert wurde, um die mit His-Tag markierten Zielproteine handelt. Die Intensitäten der Banden decken sich allgemein mit den in den Coomassie-Gelen beobachteten Intensitäten. Diese Schlussfolgerung kann auch auf die in den folgenden durchgeführten Coomassie-Gelen übertragen werden.

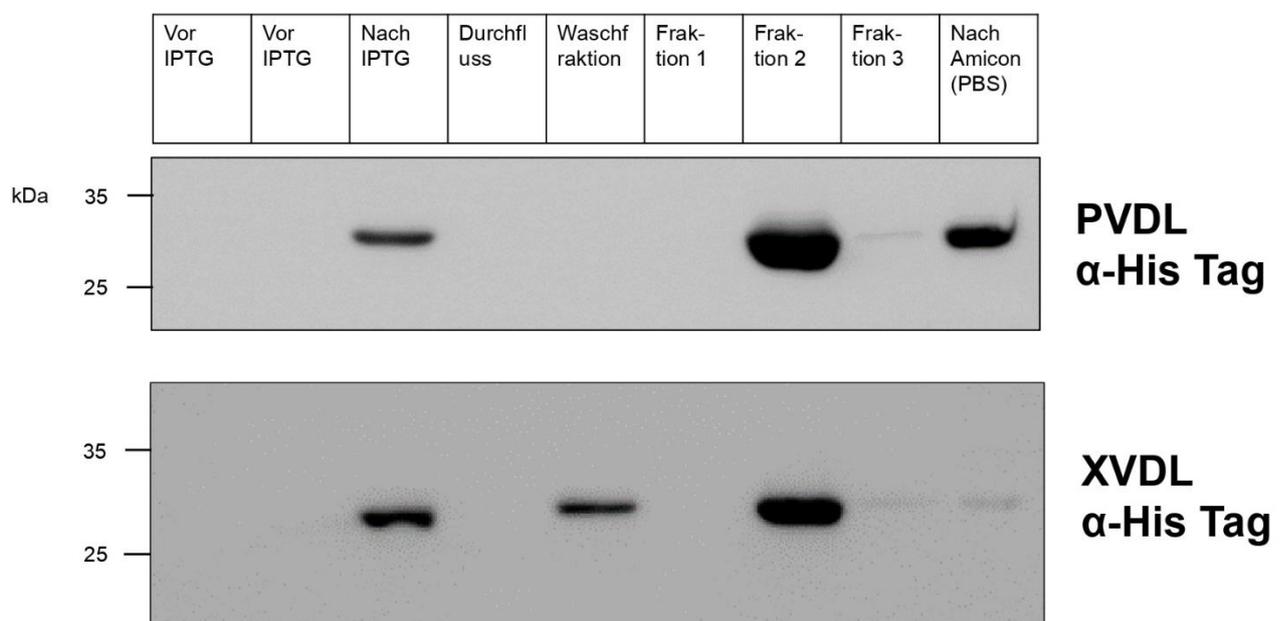


Abbildung 14: Western Blot von PVDL und XVDL.

Western-Blots mit der Nutzung eines α -His-Tag-Antikörpers wurden durchgeführt. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben vor IPTG stellt das Bakterienlysat vor Zugabe von IPTG dar. Nach IPTG repräsentiert das Bakterienlysat nach 4h IPTG-Induktion. Der Durchfluss entspricht dem Rest des Bakterienlysats, was nicht an der Säule gebunden hat. Die Waschfraktion entspricht dem Waschen der Säule mit Bindungspuffer. Fraktion 1 zeigt das erste Eluat, dass nach Zugabe des Elutionspuffers gesammelt wird. Fraktion 2 ist das Zielprotein. Fraktion 3 ist das dritte Eluat. „Nach Amicon“ zeigt die Proteinlösung nach der Umpufferung mittels Amicon-Säule.

Aufgrund des Ausfallens der Proteine nach der Amicon-Umpufferung wurden andere Methoden wie PD10 und Dialyse für die Umpufferung getestet.

4.2.3. PD10

Um die Verläufe der Aufreinigung (siehe Anhang Abbildung 23 und 24) von PVDL und XVDL für die Umpufferung mittels PD10-Säule zu überprüfen, wurde erneut die SDS-Page mit Coomassie-Färbung durchgeführt. In Abbildung 15 und 16 sind die Ergebnisse für PVDL und XVDL aufgezeigt.

Für PVDL (Abbildung 15) ist in Fraktion 1 erwartungsgemäß keine Bande zu sehen. PVDL tritt als eine intensive dicke Bande zwischen 35 und 25 kDa in Fraktion 2 und nach der Umpufferung mit der PD10 Säule auf.

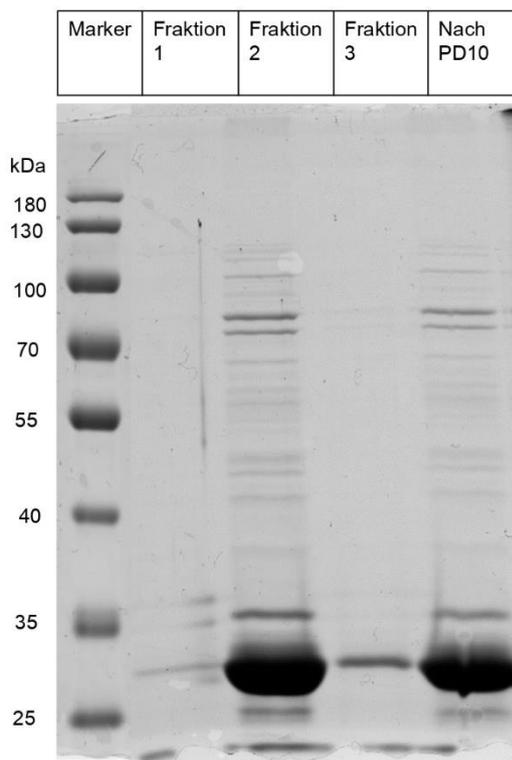


Abbildung 15: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (PVDL, PD10-Säule).

Im Anschluss an die Aufreinigung des PVDL-Proteins sowie nach dem Pufferwechseln mittels PD10-Säule wurden die Fraktionen 1, 2 und 3 sowie der Überstand nach PD10-Umpufferung auf das Coomassie Gel aufgetragen. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben.

In Abbildung 16 ist in Fraktion 1 ebenso keine Bande zu erkennen. Im Vergleich dazu wurde eine gleichmäßig intensive Banden zwischen 35 und 25 kDa in Fraktion 2 und nach der Umpufferung mit der PD10 Säule beobachtet, was XVDL entspricht. In Fraktion 3 ist jeweils eine schwächere Bande zwischen 35 und 25 kDa für beide Proteine erkennbar.

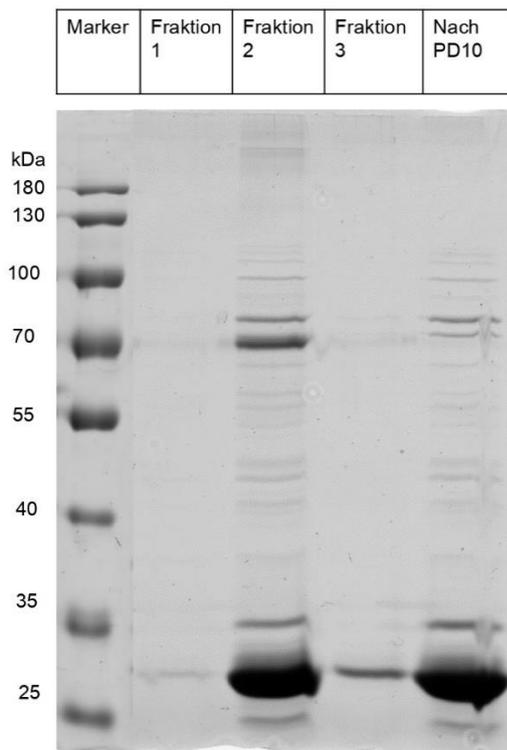


Abbildung 16: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (XVDL,PD10-Säule).

Im Anschluss an die Aufreinigung des XVDL-Proteins sowie nach dem Pufferwechseln mittels PD10-Säule wurden die Fraktionen 1, 2 und 3 sowie der Überstand nach PD10-Umpufferung auf das Coomassie Gel aufgetragen. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben.

Die Coomassie-Gele nach Aufreinigung sowie nach der Umpufferung der Proteine mittels PD10-Säule bestätigen eine erfolgreiche Transformation und Expression von PVDL und XVDL. Die Konzentration der Proteine wurden anschließend mittels Bradford-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung zeigen, dass die Konzentration von PVDL mit Gefrierschutz 0,547 µg/ml sowie ohne Gefrierschutz 0,550 µg/ml beträgt. Während die Proben von XVDL eine Konzentration mit Gefrierschutz 0,640 µg/ml sowie ohne Gefrierschutz 0,680 µg/ml ergab. Dies sind ausreichend hohe Konzentrationen für eine Behandlung von T-Zellen in Proliferationsassays.

Nach der Umpufferung mit der PD10-Säule wurde festgestellt, dass die Proteine, aufgrund von Restpuffer, der sowohl Imidazol als auch NaCl enthält, noch nicht für die Behandlung von T-Zellen geeignet sind (siehe auch Abschnitt 4.3.1). Anschließend wurde daher eine Dialyse von frisch exprimierten und eluierten Proteine durchgeführt.

4.2.4. Dialyse

Um eine geeignete Proteinkonzentration ohne Kontamination mit Imidazol oder NaCl für die Behandlung der T-Zellen zu erreichen, wurde die Umpufferung mit Dialyse durchgeführt. Die Abbildungen 17 und 18 stellen die Ergebnisse nach Dialyse dar.

In Fraktion 1 ist keine Bande zu sehen. Die charakteristische Bande zwischen 35 und 25 kDa in Fraktion 2 sowie nach der Dialyse bestätigt die erfolgreiche Isolation von XVDL und PVDL. Analog zu Fraktion 3 im Coomassie-Gel nach der PD10-Umpufferung ist auch hier eine schwächere Bande zwischen 35 und 25 kDa für beide Proteine erkennbar.

Nach dem Pufferwechsel des Proteins mittels Dialyse wurde festgestellt, dass sich in der Lösung von XVDL-Präzipitat gebildet hatte, während die PVDL-Lösung keins enthielt. Daraufhin wurde für XVDL das Präzipitat abzentrifugiert. Der Überstand sowie das Pellet dieses Zentrifugationsschrittes wurden daraufhin auf das Coomassie-Gel aufgetragen. Für die präzipitatfreie PVDL-Lösung ist eine intensive Bande nach Dialyse zu sehen, was darauf hinweist, dass PVDL nach dem Pufferwechsel vorhanden ist. Im Gegensatz dazu wurde für XVDL im Überstand sowie im Pellet eine intensive Bande beobachtet. Diese ist für das Pellet intensiver, was allerdings darauf zurückzuführen ist, dass das Pellet in einem kleineren Volumen aufgenommen wurde und daher die Proteinkonzentration deutlich höher ist. Es wurde festgestellt, dass XVDL ausfiel, trotzdem ist nach dem Pufferwechseln noch genug XVDL vorhanden. Die ermittelten Werte nach der Konzentrationsbestimmung sind wie folgt: PVDL mit Gefrierschutz 0,540 µg/ml sowie ohne Gefrierschutz 0,568 µg/ml, und XVDL mit Gefrierschutz 0,440 µg/ml sowie ohne Gefrierschutz 0,451 µg/ml.

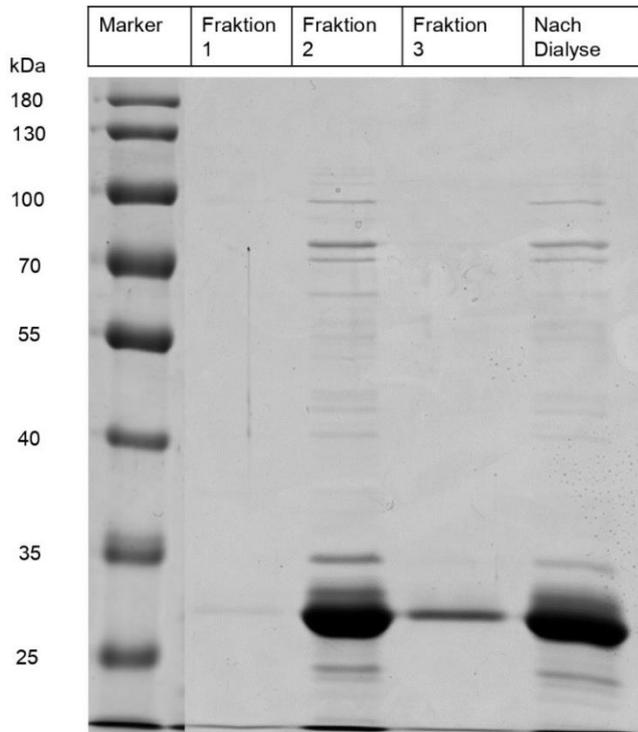


Abbildung 17: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (PVDL,Dialyse).

Im Anschluss an die Aufreinigung des PVDL-Proteins sowie nach dem Pufferwechseln mittels Dialyse wurden die Fraktionen 1, 2 und 3 sowie der Überstand nach Dialyse-Umpufferung auf das Coomassie Gel aufgetragen. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben.

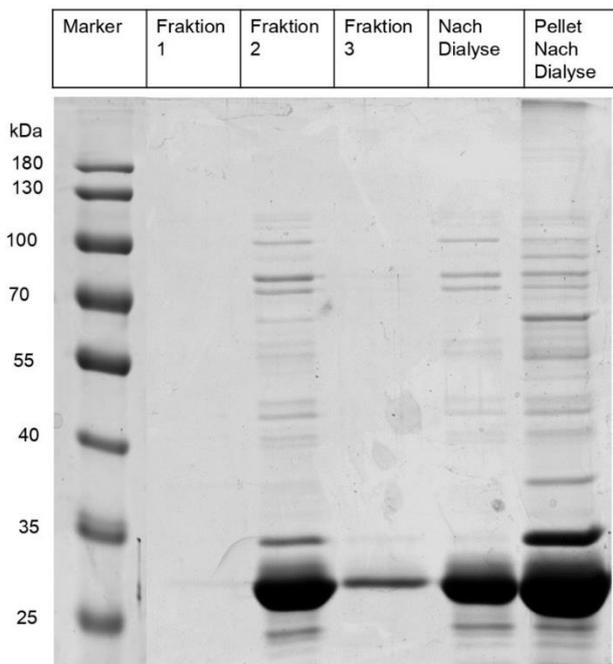


Abbildung 18: Coomassie Brilliant Blau- gefärbtes SDS-Gel (XVDL,Dialyse).

Im Anschluss an die Aufreinigung des XVDL-Proteins sowie nach dem Pufferwechseln mittels Dialyse wurden die Fraktionen 1, 2 und 3 sowie der Überstand nach Dialyse-Umpufferung auf das Coomassie Gel aufgetragen. Die Masse der Markerbanden sind links in kDa angegeben. Nach der Dialyse wurde Präzipitāt abzentrifugiert und das entstandene Pellet sowie der Überstand wurden auf das Coomassie-Gel aufgetragen.

4.3. Proliferationsassays

4.3.1. PD10 vs Dialyse

XVDL und PVDL sollten für die Behandlung von T-Zellen in Proliferationsassays eingesetzt werden. In Abbildung 19 wird das Ergebnis des Vergleiches von Umpufferung mit PD10-Säule und Dialyse gezeigt. Es wurde mit 2 bzw. 20 µg/ml XVDL behandelt. Bei der PD10-Säule wie auch Dialyse liegt der Anteil von lebenden CD4+ T-Zellen bei Behandlung mit 2 µg/ml des hergestellten XVDL-Proteins bei ca. 40 %. Im Vergleich dazu überleben bei der PD10-Säulen-Umpufferung fast nur 2% der Zellen in 20 µg/ml des hergestellten Protein, während bei der Dialyse im Mittel circa 43 % der CD4+ Zellen in 20 µg/ml des hergestellten Proteins überleben.

Das deutet darauf hin, dass die dialysierten Proteine gut vertragen wurden, während die mit der PD10-Säule umgepufferten Proteine einen toxischen Effekt auf die T-Zellen hatten. Daher wurden die dialysierten Proteine für die Proliferationsassays verwendet.

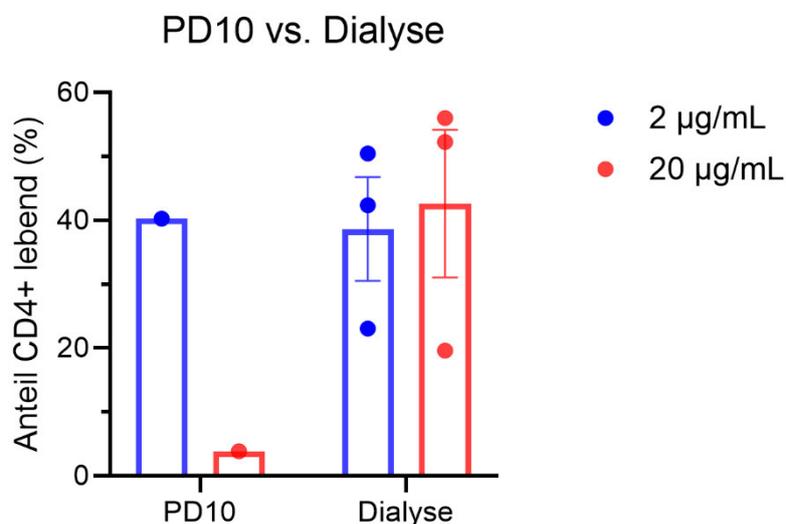


Abbildung 19: Vergleich zwischen PD10- und Dialysemethode.

CD4+ Zellen wurden vor der Behandlung entweder mit CFSE gefärbt oder ungefärbt ausgesät. Nach 72 h Stimulation und Kultivierung wurde der Anteil CD4+ lebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das verwendete XVDL wurde entweder durch eine PD10-Säule oder durch Dialyse umgepuffert. Es wurde entweder mit 2 µg/ml (blau) oder 20 µg/ml (rot) XVDL behandelt.

4.3.2. Vergleich von Proliferationsassays mit CFSE und Ki67

Nach Optimierung der Proteinisolation wurde die Behandlung der CD4+ Zellen mit dialysierten Proteinen durchgeführt.

Zuerst wurden die beiden verschiedenen Färbungen für die Auswertungen der Proliferationsassays miteinander verglichen (CFSE und Ki67). Nach Isolation der CD4+ T-Zellen (siehe Abschnitt 3.8) wurden die Zellen gezählt und stimuliert. Für die Analyse mit CFSE mussten die Zellen vor der Aussaat mit CFSE gefärbt werden, während die Ki67-Färbung erst nach den 72 h in Kultur erfolgte. Aus Abbildung 20 geht hervor, dass die mit CFSE gefärbten CD4+T-Zellen eine mittlere Überlebensrate von etwa 5 % aufwiesen, während die nicht mit CFSE gefärbten CD4+T-Zellen eine mittlere Überlebensrate von circa 45% zeigten. Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Färbung mit CFSE unter den gegebenen Bedingungen nicht für die Proliferationsassays geeignet war.

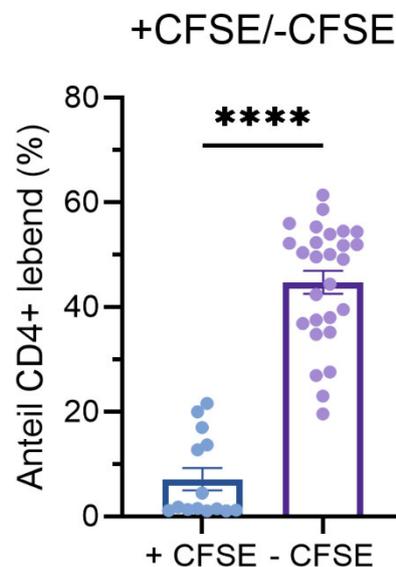


Abbildung 20: Vergleich von der Überlebensrate der mit CFSE gefärbten oder ungefärbten CD4+ T-Zellen.

CD4+ Zellen wurden vor der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von dialysiertem XVDL/PVDL oder 2G8/IgG1κ entweder mit CFSE gefärbt oder ungefärbt ausgesät. Nach 72 h Stimulation und Kultivierung wurde der Anteil CD4+ lebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind Ergebnisse aus 8 Proliferationsassays gezeigt. Die Mittelwerte wurden mit einem Mann-Whitney-Test verglichen. Statistische Signifikanz wurde mit Asterisk veranschaulicht: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) und $p \leq 0.0001$ (****). Keine Veranschaulichung der Signifikanz entspricht $p > 0.05$ (nicht signifikant).

4.3.3. Proliferationsassays mit Ki67

Da die CFSE-Färbung in mehr als drei Experimenten schädlich für die Zellen war, wurde eine andere Methode zur Proliferationsanalyse gewählt. Durch Färbung des intrazellulären Proteins Ki67 nach 72 h Stimulation kann der Anteil teilungsaktiver Zellen bestimmt werden.

Im folgenden wurden die Proliferationsassays mit Ki67 durchgeführt und die Zellen wurden mit XVDL und PVDL in zwei verschiedenen Konzentrationen (2 µg/ml und 20 µg/ml) und mit dem für XPR1 spezifischen Antikörper 2G8 und dem unspezifischen Kontrollantikörper IgG1κ in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml und 10 µg/ml) behandelt. Die Ergebnisse der Behandlung mit XVDL und PVDL sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe für drei unabhängige Experimente sind in Abbildung 21 gezeigt. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass sowohl bei Behandlung mit XVDL als auch PVDL eine ähnliche Proliferation mit einem Mittelwert von 40-60% Ki67+ T-Zellen stattfindet. Die höchste Anteil an Ki67+ Zellen ist bei der Behandlung von 20 µg/ml PVDL zu beobachten.

Eine signifikant unterschiedliche Proliferation durch Behandlung mit den Liganden konnte aufgrund der Streuung der Werte nicht erreicht werden.

Um auszuschließen, dass die Streuung durch tagesabhängige Differenzen zwischen den Wiederholungen des Experiments kommt, und daher ein Trend nicht sichtbar sein könnte, wurde eine Normalisierung auf die unbehandelte Probe durchgeführt. Die relativen Ki67+ Anteile nach Normalisierung in Bezug auf unbehandelte Proben unterscheiden sich nicht signifikant von 1. Außerdem zeigt sich kein Trend, der sich von den unnormalisierten Messwerten unterscheidet. Dies deutet darauf hin, dass sich die Zellproliferation durch XVDL/PVDL-Behandlung nur geringfügig bis gar nicht ändert.

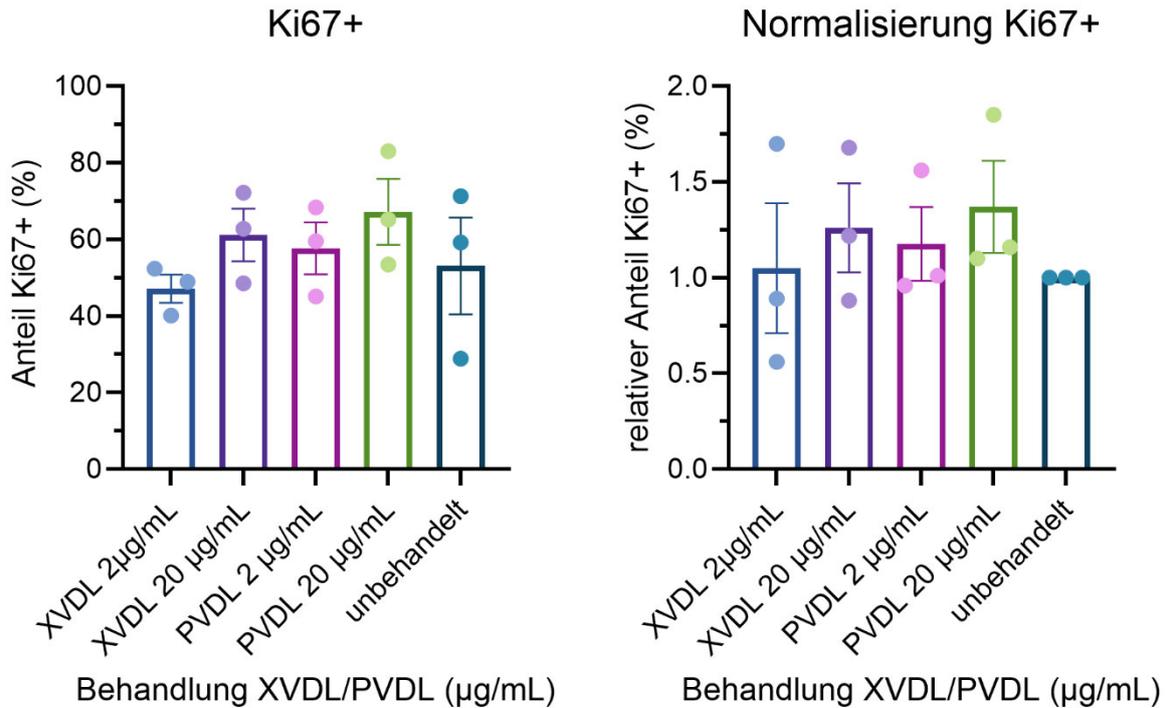


Abbildung 21: Anteil und relativer Anteil der Ki67+ T-Zellen bei der XVDL- und PVDL-Behandlung. CD4+ Zellen wurden ungefärbt ausgesät. Nach 72 h Stimulation und Kultivierung wurde der Anteil Ki67+ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurde entweder mit 2 µg/ml oder 20 µg/ml dialysiertem XVDL oder PVDL behandelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden technische Duplikate für jede Behandlung verwendet und im Abschluss gemittelt. Die Säulendiagramme entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler. Die Mittelwerte ohne Normalisierung wurden mit einem *One-way* ANOVA und folgendem Tukey-Test verglichen. Die Mittelwerte nach Normalisierung wurden mit einem *One sample* t Test verglichen. Statistische Signifikanz wurde mit Asterisk veranschaulicht: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) und $p \leq 0.0001$ (****). Keine Veranschaulichung der Signifikanz entspricht $p > 0.05$ (nicht signifikant).

Die Ergebnisse der Behandlung mit 2G8 und IgG1κ sind zusammen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe in Abbildung 22 dargestellt.

Unspezifische IgG1κ Antikörper entsprechen dem Isotyp des α-XPR1 Antikörperklons 2G8 und wurden daher hier als Negativkontrolle verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die mittleren Anteile an Ki67+ T-Zellen mit 50-60% nach Behandlung mit 2G8 oder IgG1κ ähnlich sind und sich nicht signifikant unterscheiden. Der höchste mittlere Anteil an Ki67+ T-Zellen ist bei der Behandlung mit 20 µg/ml 2G8 zu beobachten. Die relativen Ki67+ Anteile nach Normalisierung unterscheiden sich nicht signifikant von 1, was darauf hindeutet, dass die Zellproliferation nicht durch die Behandlung mit dem α-XPR1 Antikörper beeinflusst wird.

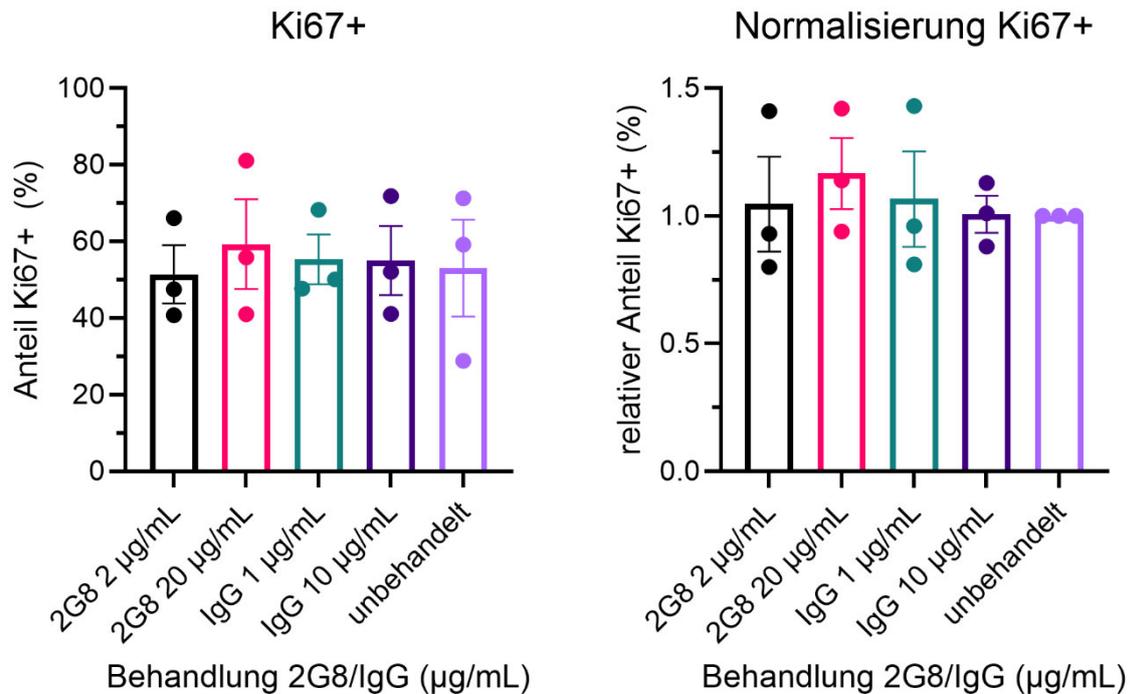


Abbildung 22: Anteil und relativer Anteil der Ki67+ T-Zellen bei der XVDL- und PVDL-Behandlung. CD4+ Zellen wurden ungefärbt ausgesät. Nach 72 h Stimulation und Kultivierung wurde der Anteil Ki67+ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurde entweder mit 1 µg/ml oder 10 µg/ml 2G8 oder IgG1k behandelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden technische Duplikate für jede Behandlung verwendet und im Abschluss gemittelt. Die Säulendiagramme entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler. Die Mittelwerte ohne Normalisierung wurden mit einem One-way ANOVA und folgendem Tukey-Test verglichen. Die Mittelwerte nach Normalisierung wurden mit einem One sample t Test verglichen. Statistische Signifikanz wurde mit Asterisk veranschaulicht: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) und $p \leq 0.0001$ (****). Keine Veranschaulichung der Signifikanz entspricht $p > 0.05$ (nicht signifikant).

5. Diskussion

5.1. PVDL- und XVDL-Herstellung

XVDL und PVDL sind rekombinante Liganden, die durch Transformation und Expression in *E.coli* hergestellt wurden. Die Aufreinigung und Umpufferung der Proteine XVDL und PVDL, die Etablierung von geeigneten Bedingungen für Proliferationsassays und die Auswirkung von XVDL/PVDL sowie des α -XPR1-Antikörpers 2G8 und der Isotypkontrolle IgG1 κ auf die Proliferationsassays von CD4⁺ T-Zellen werden in der vorliegenden Diskussion analysiert.

Zunächst wurde die Herstellung von XVDL und PVDL durchgeführt. In dem ersten Versuch wurde der Äkta-Verlauf von PVDL aufgrund von Luftblasen unterbrochen, was aber keinen Einfluss für die weitere Aufreinigung hatte. Danach wurde der Äkta Verlauf von XVDL beobachtet, bei dem XVDL unerwarteterweise auch in der Waschfraktion vorhanden war. Nach der Aufreinigung wurden die XVDL- und PVDL-Proteine mittels Amicon in PBS umgepuffert, wobei aufgrund von Präzipitat festgestellt wurde, dass die Proteine bei der Umpufferung ausgefallen sind. Dies wurde mit der niedrigen Konzentration der Proteine XVDL und PVDL nach der Konzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay bestätigt. Darüber hinaus ist der Verlust von XVDL in der Waschfraktion ein entscheidender Faktor, der auf die Proteinausbeute von XVDL einwirkt. Die unzureichende Konzentration der Proteine führen dazu, dass diese nicht für die Behandlung der T-Zellen verwendbar sind.

Im Vergleich dazu wurde eine deutliche Verbesserung der Effizienz der Proteinreinigung sowie der Proteinausbeute im zweiten Versuch erreicht. Nach der Aufreinigung wurden die Proteine mittels PD10-Säule umgepuffert. Außerdem wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay (Daten nicht gezeigt) durchgeführt. Hier wurde festgestellt, dass Rückstände des Elutionspuffers einen Einfluss auf den BCA-Assay haben könnten, da eine unerwartete, hellblaue Färbung entstand, die in Analysen von Proteinen in PBS nicht auftritt. Daher war der BCA-Assay nicht mehr verlässlich. Aus diesem Grund wurde die Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay wiederholt, wo kein Einfluss des Elutionspuffers beobachtbar war. Insbesondere konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen von PVDL und XVDL deutlich höher waren als nach der Umpufferung mit Amicon, was die Wirksamkeit der Pufferwechsel unterstützt.

Im Gegensatz dazu deuten die Ergebnisse von den Proliferationsassays, bei denen mit XVDL und PVDL behandelt wurde, welche mit PD10-Säulen umgepuffert wurden, darauf hin, dass der Pufferwechsel mittels PD10-Säule einen negativen Einfluss auf den Anteil CD4⁺ lebender T-Zellen hatte.

Die Daten unterstützen die durch die Farbänderung beim BCA-Test aufgekommene Vermutung, dass die Pufferwechsel mittels PD10 nicht erfolgreich waren und noch große Anteile des mit hohen Konzentrationen an Imidazol und NaCl hergestellten Elutionspuffers vorhanden waren, der die CD4+ T-Zellen zerstört.

Die Ergebnisse des dritten Versuches zeigen, dass die Aufreinigung trotz des erneuten Störfaktors (Luftblasen) erfolgreich war und eine sehr gute Effizienz des Pufferwechsels sowie eine hohe Proteinausbeute gegeben sind. Diese Faktoren sind entscheidend, damit die Proliferationsassays mit den funktionsfähigen PVDL und XVDL behandelt werden konnten. Hierbei zeigte sich die Dialyse als effektive Methode, mit der der Elutionspuffer sowie störende Substanzen entfernt werden konnten, was dazu führt, dass die Proteinkonzentration steigt und die Proteine in PBS für die Behandlung anwendbar ist. Ebenso wurde gezeigt, dass die Pufferwechsel effizient waren, da die Überlebensrate der CD4+ T-Zellen nach der Behandlung deutlich größer ist als im Vergleich mit PD10. Bei XVDL wurde nach Dialyse die Proteinlösung zentrifugiert, da noch Präzipitat nachgewiesen wurde. Nach Zentrifugation wurden der Überstand und das Pellet analysiert. Dabei wurde mit Coomassie-Gelen gezeigt, dass zwar das Zielprotein im Pellet nachgewiesen wird, aber für die Behandlung noch genug Protein im Überstand vorhanden ist. Damit stimmt die Konzentrationsmessung überein.

Die Ergebnisse der drei Versuche legen nahe, dass die hergestellte Proteine XVDL und PVDL für die Behandlung noch optimiert werden könnten. Es ist möglich, dass nicht nur bei Amicon und Dialyse Präzipitate entstanden sind, sondern auch bei der PD10-Säule. Es ist denkbar, dass sich Präzipitate in der PD10-Säule festgesetzt haben und durch das Säulenmedium nicht sichtbar waren. Diese Überlegung führt zu Frage, ob PBS der geeignete Puffer ist, wenn das Protein nicht in hoher Konzentration darin gelöst werden kann. Um Proteinverluste sowie Ausfall des Proteins zu verhindern, kommt die Analyse alternativer Puffer in den Fokus, um eine bessere Löslichkeit und Stabilität der Proteine zu erreichen.

5.2. Proliferationsassays

Nachdem die PVDL- und XVDL-Proteine für die Behandlung erfolgreich hergestellt wurden, begann die Isolation von CD4+ T-Zellen. Ein unerwartetes Ergebnis war der niedrige Überlebensrate der CD4+ T-Zellen in den ersten Proliferationsassays, was auf die Wirkung von CFSE hinweist. Die Proliferationsassays wurden mit CFSE und ohne CFSE durchgeführt, was die Hypothese der negativen Wirkung von CFSE auf die T-Zellen bestätigt. Die unerwartete negative Wirkung könnte durch die Verwendung einer zu hohen Farbstoffkonzentration erklärt werden.

Dabei ist es von großer Bedeutung, die Toxizität von CFSE für die Zellen zu berücksichtigen, da CFSE sich kovalent an Aminogruppen in Proteinen koppelt. Diese Bindung kann dazu führen, dass die Zellstruktur sowie Signalwege geschädigt werden, die für das Überleben der Zellen und die Proliferation dieser wichtig sind. Im Gegensatz dazu zeigen die Proliferationsassays ohne CFSE-Färbung eine höhere Überlebensrate der CD4+ T-Zellen.

Die Fragestellung dieser Arbeit zielt darauf ab, ob eine Behandlung mit XPR1- Liganden oder Antikörpern, die mit XPR1 interagieren, T-Zell-Effektorfunktionen modulieren können. Die Proliferationsassays mit anschließender Ki67+ Färbung adressieren dies.

Es wurde erwartet, dass durch die Modulation von Xpr1 bei der Behandlung mit XVDL-Protein, das mit Xpr1 interagiert und des Antikörpers 2G8 (α -XPR1) eine Veränderung der CD4+ T-Zell-Proliferation nachgewiesen wird. Diese Erwartung basiert darauf, dass in vorläufigen Daten der AG Mailer eine schnellere T-Zell-Proliferation bei Xpr1-Knockout gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle wurden PVDL und α -IgG1k verwendet.

Die Behandlung der CD4+ T-Zellen mit den hergestellten PVDL- und XVDL-Proteinen sowie mit den Antikörpern 2G8 (α -XPR1) und IgG1k zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation.

Dies weicht von den vorliegenden Ergebnissen von den Erkenntnissen von Mailer *et al.* 2021 ab. In der Studie von Mailer *et al.* 2021 wurden Thrombozyten mit XVDL und PVDL behandelt, wobei eine Erhöhung der intrazellulären Polyphosphat-Spiegel für XVDL, nicht aber für die Kontrolle PVDL gezeigt wurde. Es wurde festgestellt, dass XVDL die Aktivität von Xpr1 spezifisch beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden T-Zellen und nicht Thrombozyten mit XVDL und PVDL behandelt, was zum Unterschied führen könnte. Es ist bekannt, dass Xpr1 membrangebunden ist und im Thrombozyten findet es sich höchstwahrscheinlich an der Zelloberfläche, wo es als Phosphatexporter wirkt. Im Gegensatz dazu ist die Lokalisation von Xpr1 in T-Zellen unbekannt. Außerdem gibt es in T-Zellen keine große Veränderung von Polyphosphat durch XVDL-Knock out (Daten nicht gezeigt). Es könnte sein, dass die Funktion von Xpr1 für Thrombozyten wahrscheinlich eher mit dem Phosphattransport von Xpr1 zusammenhängt, während in T-Zellen Xpr1 mit anderen Proteinen interagiert, um die T-Zell-Signalwege zu beeinflussen. Im Weiteren wurde in den Studien von Huttlin *et al.* 2017 und (Huttlin *et al.* 2021) gezeigt, dass Xpr1 mit anderen Membranproteinen wie z.B. den immunregulierenden Molekülen PD1 oder CTLA4 interagiert und daher eine Funktion haben könnte. Dies könnte darauf hindeuten, dass Xpr1 mit dem Liganden sowie dem Antikörper nicht an der richtigen Bindungsstelle gekoppelt wird. Dadurch zeigte sich dann demzufolge kein spezifischer Einfluss bzw. Effekt auf die Proliferation.

Die vorherige Vermutung wird auf die Lokalisation von *Xpr1* gestützt. Die Studie von Li *et al.* 2024 zeigt, dass XPR1 im Kontext von humanen Osteosarkom-Zelllinien als Interaktionspartner wichtig ist, um die Lokalisation anderer Proteine zu modulieren, so kann dies theoretisch in T-Zellen geschehen. Im Weiteren ist XPR1 wichtig für die Endozytose und reguliert die Expression und Funktion von Proteinen. Dies geschieht in spezialisierten vesikulären Kompartimenten (Li *et al.* 2024). Basierend auf den Ergebnissen von Li *et al.* 2024 kann vermutet werden, dass sich *Xpr1* nicht auf der Oberfläche von T-Zellen befinden, sondern in Vesikeln im Inneren der Zellen, wodurch die Behandlung nicht funktionieren könnte, weil XVDL- und PVDL-Liganden sowie den *Xpr1*-Antikörpern gar nicht ins Zytosol gelangen, sondern an nur an der Zelloberfläche wirken würden.

Trotz der Ergebnisse, die keine signifikanten Effekte zeigten, bietet sich die Möglichkeit, zusätzliche Methoden wie ELISA einzusetzen, um die Ergebnisse zu validieren. Dazu könnten die Überstände nach dem Proliferationsassay gesammelt werden und der IL2-Gehalt gemessen zu werden, was ein alternativer *Readout* für T-Zell-Effektorfunktionen wäre. Für zukünftige Forschungsarbeit wäre es wichtig, zusätzliche Techniken zu integrieren, die eine spezifischere Messung ermöglichen. In diesem Zusammenhang sollte besonders darauf geachtet werden, die Reinheit und die Proteinausbeute zu optimieren.

6. Anhang

6.1. Verlauf der Aufreinigung von PVDL und XVDL

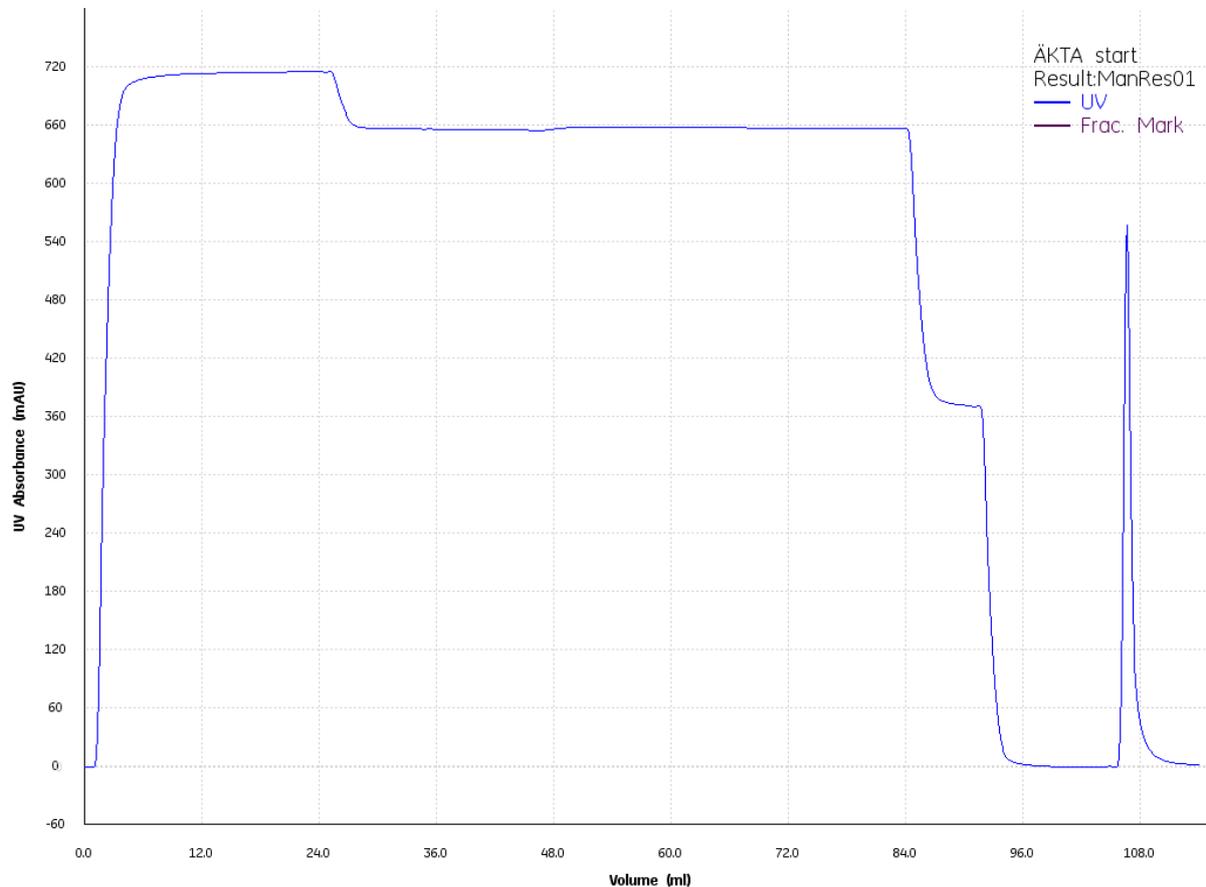


Abbildung 23: Verlauf der Aufreinigung von PVDL (PD10).

Nach der Transformation und Expression wurde das Protein XVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem kleinen Peak entspricht.

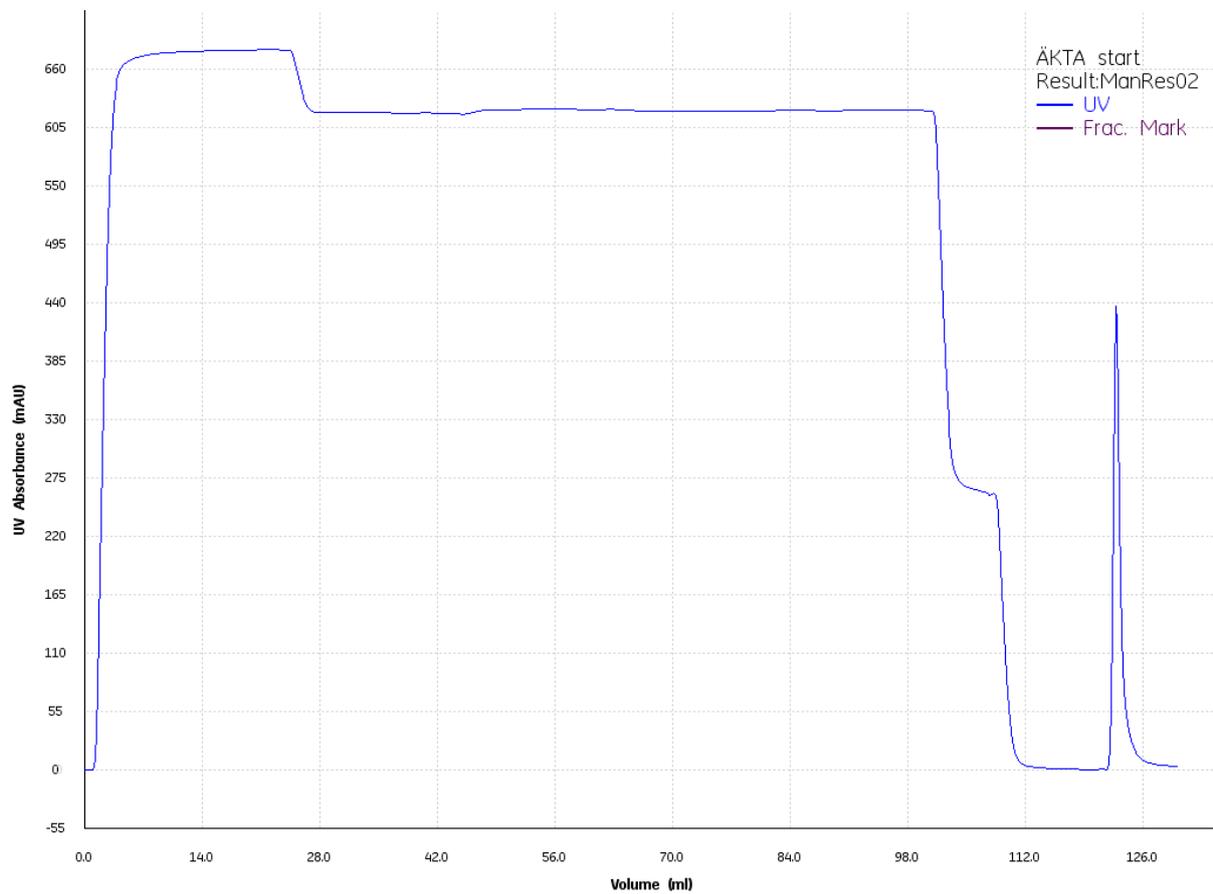


Abbildung 24: Verlauf der Aufreinigung von XVDL (PD10).

Nach der Transformation und Expression wurde das Protein PVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem kleinen Peak entspricht.

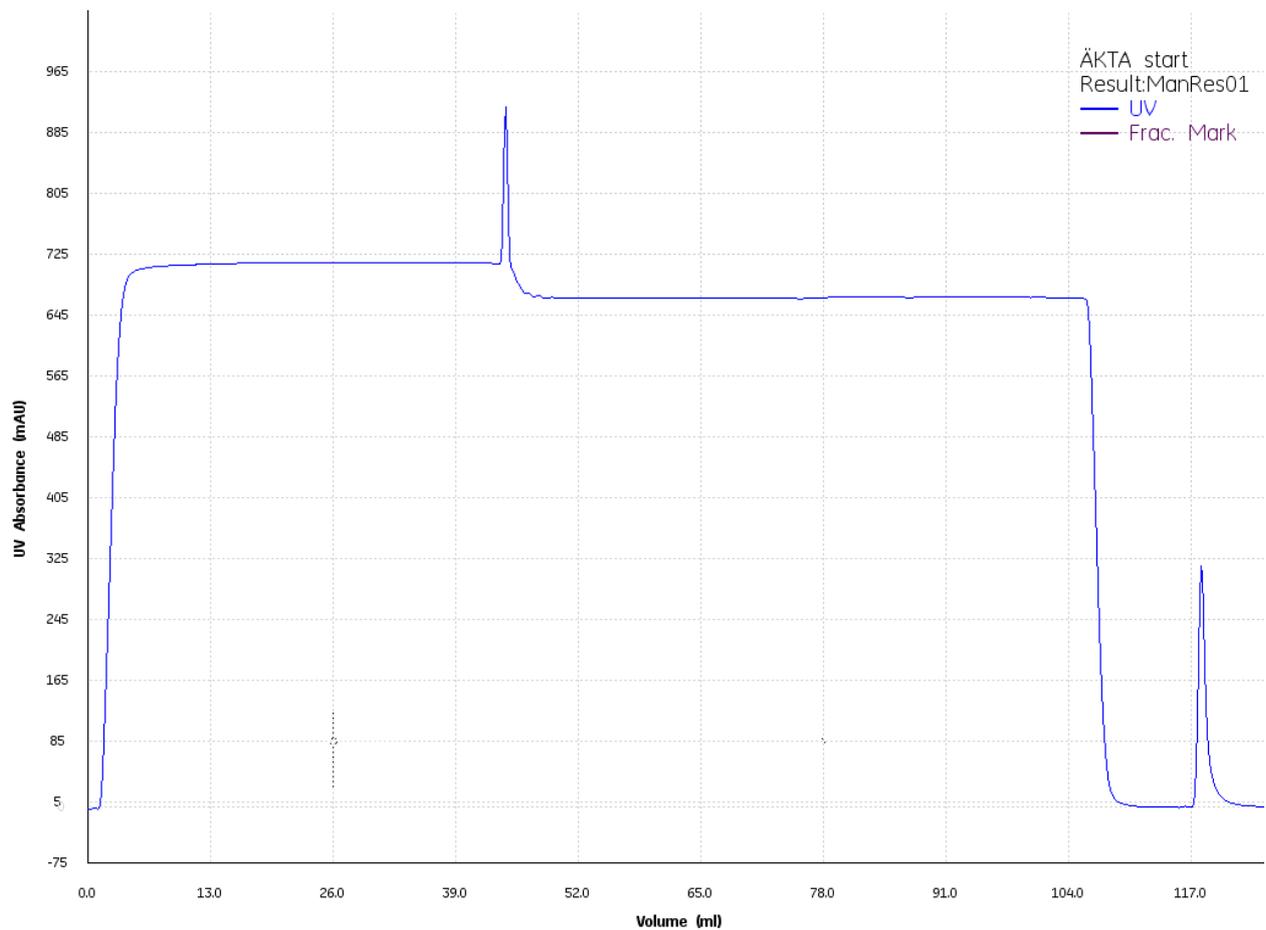


Abbildung 25: Verlauf der Aufreinigung von PVDL (Dialyse).

Nach der Transformation und Expression wurde das Protein XVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem kleinen Peak entspricht.

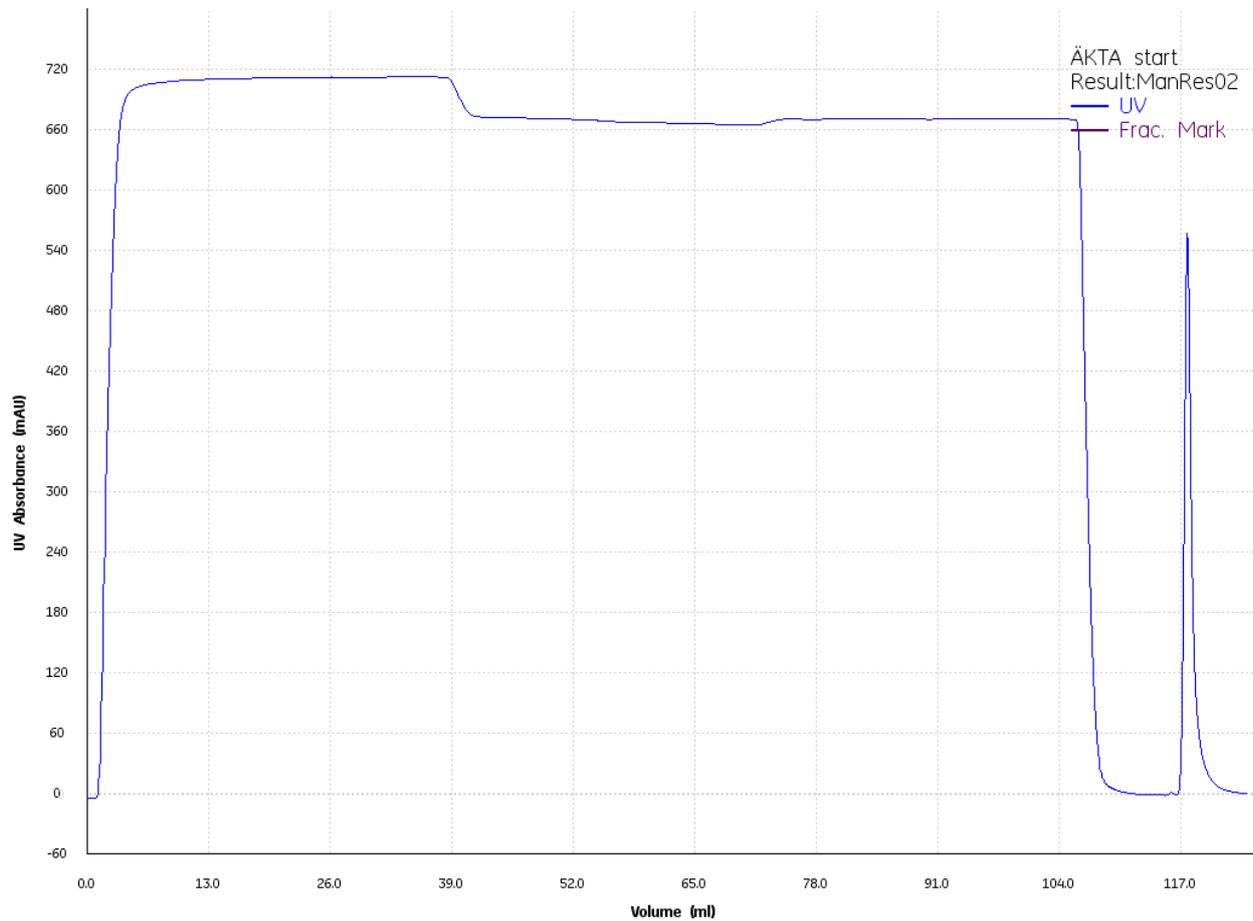


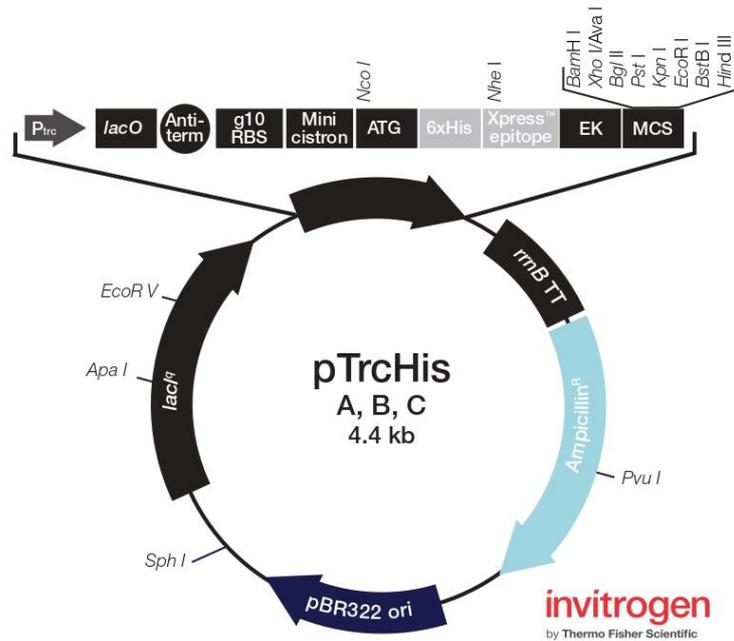
Abbildung 26: Verlauf der Aufreinigung von XVLD (Dialyse).

Nach der Transformation und Expression wurde das Protein PVDL mit HPLC aufgereinigt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die gegen das Volumen an Flüssigkeit, das über die Säule gespült wurde, aufgetragen ist. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und es wurde gewaschen. Zum Schluss wurde der Elutionspuffer, der die gebundenen Proteine eluiert, dazugegeben. Die Fraktionen 1, 2 und 3 wurden aufgefangen, wobei Fraktion 2 dem kleinen Peak entspricht.

6.2. Plasmidmap

Comments for pTrcHis B
4404 base pairs

trc promoter: bases 191-221
lac operator: bases 228-248
mB anti-termination sequence: bases 264-333
T7 gene 10 translational enhancer: bases 346-354
 Ribosome binding site: bases 370-374
 Mini cistron: bases 383-409
 6xHis tag and enterokinase cleavage site: bases 425-504
 Xpress™ epitope: bases 482-505
 Multiple cloning site: bases 515-554
mB transcriptional termination sequence: bases 637-794
 Ampicillin resistance (*bla*) gene ORF: bases 1074-1934
 pBR322 origin: bases 2079-2752
lacZ ORF: bases 3281-4365



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Abbildung 27: Plasmidmap (Hersteller Thermo Fisher Scientific, erstellt von Thermo Fisher Scientific).

7. Literaturverzeichnis

- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, et J. C. Howard. 1997. 'Cellular Responses to Interferon-Gamma'. *Annual Review of Immunology* 15:749–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749>.
- Cytiva. 2021. 'PD-10 Desalting Column'. <https://www.cytivalifesciences.com/chromatography/prepacked-columns/desalting-and-buffer-exchange/sephadex-g-25-in-pd-10-desalting-columns>.
- Cytiva. 2023. 'Purification of an N-terminal histidine-tagged protein using ÄKTA start'. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-16747-pdf>.
- Givan, Alice Longobardi. 2001. *Flow Cytometry: First Principles*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss.
- Huttlin, Edward L., Raphael J. Bruckner, Jose Navarrete-Perea, Joe R. Cannon, Kurt Baltier, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, et al. 2021. 'Dual Proteome-scale Networks Reveal Cell-specific Remodeling of the Human Interactome'. *Cell* 184 (11): 3022-3040.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.011>.
- Li, Xingyao, Regan B. Kirkpatrick, Xiaodong Wang, Charles J. Tucker, Anuj Shukla, Henning J. Jessen, Huanchen Wang, Stephen B. Shears, et Chunfang Gu. 2024. 'Homeostatic coordination of cellular phosphate uptake and efflux requires an organelle-based receptor for the inositol pyrophosphate IP₈'. *Cell Reports* 43 (6): 114316. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114316>.
- Luckheeram, Rishi Vishal, Rui Zhou, Asha Devi Verma, et Bing Xia. 2012. 'CD4+T Cells: Differentiation and Functions'. *Clinical and Developmental Immunology* 2012:925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
- Mailer, Reiner K., Mikel Allende, Marco Heestermans, Michaela Schweizer, Carsten Deppermann, Maïke Frye, Giordano Pula, et al. 2021. 'Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1 Regulates Procoagulant Platelet Polyphosphate'. *Blood* 137 (10): 1392–1405. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004617>.
- Matsumoto, Hiroyuki, Hisao Haniu, et Naoka Komori. 2019. 'Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE'. In *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, a cura Biji T. Kurien et R. Hal Scofield, 101–5. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10.
- Murphy, Kenneth, et Casey Weaver. 2018. 'Die T-Zell-vermittelte Immunität'. *Janeway Immunologie*, aprilis, 443–515. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_9.
- Nakayama, Toshinori, Kiyoshi Hirahara, Atsushi Onodera, Yusuke Endo, Hiroyuki Hosokawa, Kenta Shinoda, Damon J Tumes, et Yoshitaka Okamoto. 2017. 'Th2 Cells in Health and Disease'.

- O'Shea, John J., et William E. Paul. 2010. 'Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science (New York, N.Y.)* 327 (5969): 1098–1102. <https://doi.org/10.1126/science.1178334>.
- Parish, C. R. 1999. 'Fluorescent Dyes for Lymphocyte Migration and Proliferation Studies'. *Immunology and Cell Biology* 77 (6): 499–508. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x>.
- Prete, G. Del. 1992. 'Human Th1 and Th2 Lymphocytes: Their Role in the Pathophysiology of Atopy'. *Allergy* 47 (5): 450–55. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1992.tb00662.x>.
- Quah, Benjamin J. C., et Christopher R. Parish. 2010. 'The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation'. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n. 44 (october), 2259. <https://doi.org/10.3791/2259>.
- Sigma-Aldrich. 2023. 'Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 15 mL'. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/341/606/pr05035w-rev1023-mk.pdf>.
- Stark, Julian M., Christopher A. Tibbitt, et Jonathan M. Coquet. 2019. 'The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation'. *Frontiers in Immunology* 10 (september):2318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02318>.
- Suen, W. E., C. M. Bergman, P. Hjelmström, et N. H. Ruddle. 1997. 'A Critical Role for Lymphotoxin in Experimental Allergic Encephalomyelitis'. *The Journal of Experimental Medicine* 186 (8): 1233–40. <https://doi.org/10.1084/jem.186.8.1233>.
- Sun, Lina, Yanhong Su, Anjun Jiao, Xin Wang, et Baojun Zhang. 2023. 'T cells in health and disease'. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (iunius):235. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>.
- Thermo Fisher Scientific. 2023. 'Dialysis Cassettes User Guide-Product Code 66811'. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/66811>.
- Trinchieri, Giorgio, Stefan Pflanz, et Robert A Kastelein. 2003. 'The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses'. *Immunity* 19 (5): 641–44. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00296-6).
- Waldman, Alex D., Jill M. Fritz, et Michael J. Lenardo. 2020. 'A Guide to Cancer Immunotherapy: From T Cell Basic Science to Clinical Practice'. *Nature Reviews Immunology* 20 (11): 651–68. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>.
- Williams, Matthew A., Aaron J. Tzysnik, et Michael J. Bevan. 2006. 'Interleukin-2 Signals during Priming Are Required for Secondary Expansion of CD8+ Memory T Cells'. *Nature* 441 (7095): 890–93. <https://doi.org/10.1038/nature04790>.

8. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Thomas Renné dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Bachelorarbeit am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durchzuführen.

Des Weiteren danke ich Herr Prof. Dr. Julien Béthune für seine engagierte Betreuung sowie für seine hilfreiche und freundliche Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herr Dr. Reiner Mailer für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit der Verfassung meiner Bachelorarbeit in seiner Arbeitsgruppe herzlich bedanken. Ich schätze Ihre hervorragende Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön geht an Marion Mengel, die mir mit großem Engagement die notwendigen Methoden beigebracht und mich stets mit wertvollen Tipps unterstützt hat. Ihr wertvoller fachkundiger Rat, die Bereitschaft und die ausführliche Überbearbeitung meiner Arbeit waren unschätzbare. Außerdem möchte ich mich herzlich für die großartige Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank richtet sich auch an dem gesamten Team des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin und allen Kolleginnen und Kollegen der verschiedenen Arbeitsgruppen für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Es hat mir große Freude bereitet, Teil des Teams zu sein.

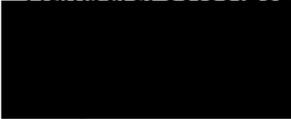
Ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie, meine Eltern und Geschwistern, die meine Motivation und Inspiration sind. Vielen Dank für eure Unterstützung und eure bedingungslose Liebe. Danke, dass ihr an mich glaubt und meine größte und liebste Begleitung auf diesem Weg seid.

Diese Arbeit widme ich Wilson und Angela.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind in allen Fällen unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Hamburg, 09.09.2024



Renáta Aguilar