

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,  
Nephrologie, Rheumatologie)

**Untersuchungen zum immunsuppressiven Potential  
humaner nicht TCR-stimulierter V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$  $\delta$  T-Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Kind, Janika Rosalie**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Christopeit

Tag der Disputation: 18.09.2024

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen.....	1
1.2 Regulatorische T-Zellen und die Reifung von T-Zellen im Thymus .....	2
1.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen .....	5
1.4 V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen .....	9
1.5 TCR-abhängige Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	9
1.6 Adoptiver Immuntransfer .....	11
1.7 TCR-unabhängige Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	15
1.8 PD-1-/PD-L1-Interaktion .....	16
1.9 Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden .....	21
2.1 Probanden, Vorbereitung, Blutentnahme.....	21
2.2 Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Isolation .....	21
2.3 Negative $\gamma\delta$ -T-Zell-Isolation (untouched).....	22
2.3.1 EasySep human $\gamma\delta$ -T-cell-Isolation-Kit [STEMCELL].....	22
2.3.2 TCR $\gamma\delta$ -Isolation-Kit, human [Miltenyi Biotec].....	24
2.4 V $\delta$ 1-Depletion nach negativer T-Zell-Isolation.....	26
2.5 Stimulation mit IL-12,-15,-18 nach negativer T-Zell-Isolation.....	27
2.6 PBMC Stimulation mit anti-CD3/CD28-Microbeads.....	28
2.7 CFSE-Proliferations-Assay .....	29
2.8 Mixed lymphocyte culture (MLC) .....	30
2.9 FACS-Analysen .....	31
2.10 Apoptose-Assay.....	33
2.11 RNA-Extraktion .....	35
2.12 cDNA-Synthese .....	35
2.13 Quantitative PCR (qPCR: realtime PCR)).....	36
2.14 Statistische Methoden .....	37
2.15 Ethik-Votum .....	37

3	Ergebnisse.....	38
3.1	Gewinnung von untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen aus PBMCs.....	38
3.1.1	Bestimmung der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2-Frequenz in PBMCs vor Isolation.....	38
3.1.2	Vergleich des CD16 <sup>+</sup> und CD16 <sup>-</sup> Isolation Cocktails.....	39
3.1.3	Negative Isolation von untouched Pan- $\gamma\delta$ T-Zellen aus PBMC.....	42
3.1.4	Bestimmung der Reinheit von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach V $\delta$ 1-Depletion....	44
3.2	Apoptoseinduktion in autologen, CD3/CD28-aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen bzw. bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen.....	45
3.3	Immunsuppressives Potential von untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen und bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen gegenüber autologen, CD3/CD28-aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen.....	48
3.4	PD-L1 und PD-1 Expression als Marker des zytotoxischen und des Apoptose-induzierenden Potentials von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen.....	51
3.4.1	PD-L1 und PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen vor MLC (Proteom) 53	
3.4.2	PD-L1 und PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in qPCR vor MLC (Transkriptom).....	54
3.4.3	Vergleich von PD-1 und PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in qPCR (Transkriptom) und FACS (Proteom) vor MLC.....	55
3.4.4	PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC.....	56
3.4.5	Korrelation zwischen PD-L1-Expression (Proteom) und Apoptose-Induktion.....	57
3.4.6	Korrelation zwischen PD-L1-Expression (Proteom) und immunsuppressivem Potential.....	58
3.4.7	PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC.....	59
3.4.8	Korrelation zwischen PD-1-Expression (Proteom) und Apoptose-Induktion.....	60
3.4.9	Korrelation zwischen PD-1-Expression (Proteom) und immunsuppressivem Potential.....	61
4	Diskussion.....	62
5	Zusammenfassung.....	80
6	Literaturverzeichnis.....	82
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	91
8	Veröffentlichungen.....	92
9	Danksagung.....	93
10	Lebenslauf.....	94

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Immuntransfer mit in-vitro Zell-Stimulation.....	12
Abbildung 2:	Vereinfachte schematische Darstellung zur Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 im Tumorkontext [95] .....	19
Abbildung 3:	PBMC Isolation vor und nach Dichtegradientenzentrifugation	21
Abbildung 4:	Magnetische Separation mit EasySep Magneten .....	24
Abbildung 5:	Magnetische Separation mit $\gamma\delta$ -T-cell-Isolation-Kit, human von Miltenyi Biotec.....	26
Abbildung 6:	Stimulation negativ-isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zytokinen für 20 Stunden über Nacht .....	28
Abbildung 7:	CFSE-Proliferations-Assay Grundlagen-Schema .....	30
Abbildung 8:	MLC-Schema 96-well-plate.....	31
Abbildung 9:	Schematische Darstellung zur Analyse des Apoptose Assay mithilfe des FACS .....	34
Abbildung 10:	Cut-off-Wert Bestimmung für Apoptose Assay .....	34
Abbildung 11:	Ablaufschema qPCR.....	37
Abbildung 12:	Ablauf der Isolation von untouched isolierten $V\delta 2$ -T-Zellen ....	38
Abbildung 13:	$V\gamma 9\delta 2$ -Frequenzanalyse in isolierten PBMCs veranschaulicht an einem repräsentativen Probanden .....	38
Abbildung 14:	Anteil der $V\gamma 9\delta 2$ T-Zellen an PBMCs bei den 7 Probanden [%] .....	39
Abbildung 15:	FACS-Analyse zur Detektion von $CD16^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen vor und nach negativer Isolation .....	40
Abbildung 16:	Schema für FACS-Analyse zur Reinheit der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Isolation veranschaulicht an einem repräsentativen Probanden .....	42

Abbildung 17: Reinheit der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Isolation mit dem CD16-freien-Cocktail [%] .....	42
Abbildung 18: Schema für FACS Analyse zur Differenzierung zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen mit V $\delta$ 1-Rezeptor und V $\delta$ 2-Rezeptor nach Isolation veranschaulicht an einem repräsentativen Probanden .....	43
Abbildung 19: Anteil der $\gamma\delta$ -Subpopulationen an der Gesamtheit der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Negativ-Isolation [%].....	44
Abbildung 20: Anteil der $\gamma\delta$ -Subpopulationen an der Gesamtheit der $\gamma\delta$ T-Zellen nach V $\delta$ 1-Depletion [%].....	44
Abbildung 21: Repräsentative FACS-Analyse der Apoptoseinduktion in $\alpha\beta$ T-Zellen durch autologe V $\delta$ 2-T-Zellen .....	45
Abbildung 22: Repräsentative Veranschaulichung der Apoptoseinduktion in autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen bzw. bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [%].....	46
Abbildung 23: Apoptoseinduktion bei CD3/CD28 aktivierten, autologen $\alpha\beta$ T-Zellen [%] .....	47
Abbildung 24: Repräsentative FACS-Analyse zum immunsuppressiven Potential von V $\delta$ 2 T-Zellen gegenüber autologen $\alpha\beta$ T-Zellen [%].....	48
Abbildung 25: Darstellung eines Suppressionsassays für die 4 unterschiedlichen Ansätze in der FACS-Analyse zum immunsuppressiven Potential von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen .....	49
Abbildung 26: Inhibierung der Proliferation aktivierter, autologer $\alpha\beta$ T-Zellen durch V $\delta$ 2-T-Zellen [%] .....	51
Abbildung 27: Repräsentative FACS-Analyse zur Expression von PD-L1 und PD-1 auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [%].....	52
Abbildung 28: PD-1 Expression auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=2] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC [%].....	53

Abbildung 29: PD-L1 Expression auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=3] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC [%].....	53
Abbildung 30: PD-1 mRNA-Level auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=4] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC .....	55
Abbildung 31: PD-L1 mRNA-Level auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=4] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC .....	55
Abbildung 32: PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC [%] .....	57
Abbildung 33 Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in MLC induzierten Apoptoserate von aktivierten, autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen....	58
Abbildung 34: Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in MLC induzierten Inhibierung der Proliferation von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen. ....	59
Abbildung 35: PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC.....	60
Abbildung 36: Korrelation zwischen der PD-1-Expression und der in MLC induzierten Apoptoserate von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen. ....	61
Abbildung 37: Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in MLC induzierten Inhibierung der Proliferation von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen. ....	61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	In den Experimenten verwendete Zytokine und ihre allgemeinen Funktionen .....	16
Tabelle 2:	FACS-Analyse- Schemata .....	32
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisch für die qPCR-Analyse .....	36
Tabelle 4:	Primer-Sequenzen für qPCR .....	36
Tabelle 5:	Vergleich der Reinheit und Frequenz der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Isolation durch aCD16+ oder aCD16- Isolations-Kit.....	41

## Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
CA	Karzinom
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Desoxyribonucleicacid
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
DNA	Desoxyribonucleicacid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	Fluorescence Minus One
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FPP	Farnesyl-Diphosphat
FSC-A	Forward Scatter Area
FSC-H	Forward Scatter Height
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HMBPP	(E-)4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphate
IL	Interleukin
ILR	Interleukin-Rezeptor

INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
mAB	mononuklearer Antikörper
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
MICB	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence B
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
NKG2D	Natural-Killer-Group-2-Member-D
NK-Zellen	natürliche Killerzelle
NSLC	non small lung cancer
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD	progressive disease
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PR	Teilremission
qPCR	Quantitative Polymerase-Chain-Reaction
RNA	Ribonucleicacid
Rpm	Rounds per Minute

RPMI	<i>Eigenname für Zellkulturmedium: Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	stable disease
SSC-A	Sideward Scatter Area
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor
TH	T-Helferzelle
TME	Tumormikroumgebung
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zelle
ZOL	Zoledronat

## **1 Einleitung**

In der Gruppe der T-Lymphozyten im peripheren Blut findet sich eine kleine Untergruppe: die  $\gamma\delta$  T-Zellen. In den letzten Jahren haben diese  $\gamma\delta$  T-Zellen eine immer größere Aufmerksamkeit in wissenschaftlichen Beobachtungen, aber auch im klinischen Kontext erhalten. Viele Studien befassen sich derzeit mit  $\gamma\delta$  T-Zell-Tumorthérapien, mit dem Ziel eine breite Anwendung im klinischen Alltag zu etablieren [1-13]. Umso wichtiger ist es, dass die Funktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem auch in Bezug auf ihre Stimulationsformen und deren Auswirkungen auf die Funktion besser und differenzierter verstanden wird.

### **1.1 Grundlagen**

Das Immunsystem macht einen großen und wichtigen Teil des menschlichen Körpers aus. Um Struktur in dieses komplizierte Konstrukt zu bringen, kann man es in das adaptive und das angeborene Immunsystem unterteilen.

Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen zellulären und humoralen Komponenten. Zum zellulären Teil zählen die Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen, zum humoralen Anteil unter anderem das Komplementsystem. Außerdem bilden Epithelien eine natürliche Barriere, die den Körper vor äußeren, schädlichen Einflüssen schützen soll. Zu diesen zählen auch pathogene Erreger wie Viren, Bakterien oder Pilze.

Zum adaptiven Immunsystem hingegen zählen sowohl die T- als auch die B-Lymphozyten, die Antigene erkennen und dann eine Immunantwort, zum Beispiel über die Produktion von Antikörpern (AK), hervorrufen können.

Zwischen den verschiedenen Komponenten des Immunsystems besteht ein physiologisches Gleichgewicht aus gegenseitiger Aktivierung, Regulation und Suppression. Kommt es zu einem Ungleichgewicht dieser Komponenten, können verschiedene Krankheitsbilder wie Autoimmun- oder Tumorerkrankungen entstehen.

## 1.2 Regulatorische T-Zellen und die Reifung von T-Zellen im Thymus

Immunzellen müssen sich gegenseitig regulieren, um eine übermäßige Aktivierung zu verhindern. Sie werden unter anderem durch sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg) kontrolliert und ihre Aktivität in einem, für den Körper gesunden Rahmen gehalten. Diese Treg nehmen etwa 4-10 % der Immunzellen ein [14] und haben die Aufgabe Entzündungsreaktionen im Körper einzudämmen, damit durch Überaktivierung keine Autoimmunerkrankungen entstehen [15].

Bei der Reifung der T-Zellen im menschlichen Körper spielen vor allem zwei Mechanismen eine wichtige Rolle. Der Reifungsprozess von T-Zellen findet, anders als bei den B-Zellen, nicht im Knochenmark, sondern im Thymus statt. Die beiden zentralen Kontrollvorgänge bei der Reifung von T-Zellen im Thymus sind die positive und die negative Selektion. Durch diese Mechanismen soll sichergestellt werden, dass die T-Zellen mit ihrem Rezeptor genug Affinität zu Antigenen aufweisen, die ihnen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden (positive Selektion). Diese Affinität zum Antigen sollte gleichzeitig nicht zu stark ausgeprägt sein, da hierdurch eine autoimmune Reaktion durch Aktivierung in der Peripherie entstehen könnte (negative Selektion). Verfügen T-Zellen also über eine zu starke oder zu schwache Bindungskapazität bei ihrer Reifung im Thymus, gehen sie durch Apoptose zugrunde.

Trotz dieser Mechanismen der „zentralen Toleranz“ gibt es T-Zellen, die den Thymus mit starker Affinität für den Eigen-Major-Histocompatibility-Complex (MHC) verlassen. Damit diese T-Zellen in der Peripherie keinen Schaden anrichten, gibt es verschiedene Regulationsmechanismen, die alle unter dem Begriff der „peripheren Toleranz“ zusammengefasst werden können. Diese Mechanismen der „peripheren Toleranz“, die physiologisch T-Zellen und autoreaktive T-Zellen beeinflussen und die Anzahl der Lymphozyten ständig in einem engen Rahmen zwischen Aktivierung und Vermehrung halten, kontrollieren die Homöostase.

Zu den Mechanismen gehört unter anderem die Induktion von Anergie bei T-Zellen durch fehlende Ko-Stimulation (*missing second signal*). Beispielsweise durch die Interaktion von CD28 mit CD80 bzw. CD86 [16]. Der Ko-Stimulation liegt die Theorie zugrunde, dass T-Zellen zur vollständigen Aktivierung nach Antigenpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) ein zweites Signal in Form der Ko-Stimulation benötigen. Ko-Stimulation ist wichtig für die Entwicklung, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen [16]. Diese Ko-Stimulation kann sowohl eine positive/stimulierende als auch eine negative/inhibierende Regulation der Zellen bewirken [16].

Wichtig für das Prinzip der peripheren Toleranz sind Rezeptoren, die negative Signale an T-Zellen übermitteln. Dazu gehört unter anderem die Interaktion zwischen den beiden Oberflächenrezeptoren PD-1 (CD279, B7-H1) und PD-L1 (CD274) [17]. Tsushima et al. zeigten, dass eine Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1 dazu führt, dass T-Zellen nicht mehr auf Antigene reagieren und es zu einer T-Zell-Anergie kommt [18]. Eine Blockade der Interaktion dieser beiden Rezeptoren durch einen Antikörper konnte diese Anergie der T-Zellen aufheben [18]. Anergie von T-Zellen kann zum Beispiel auch durch eine Interaktion zwischen PD-L1 und CD80 (B7-1) hervorgerufen werden. Park et. al zeigten, dass eine Blockade der Interaktion dieser beiden Rezeptoren durch Antikörper zu einer Expansion von T-Zellen führte [19]. Ein weiterer Ligand für CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) ist CTLA-4 (CD152). Die Interaktion von CD80/86 mit CTLA-4 bewirkt ebenfalls eine negative Regulation von T-Zellen [20]. Wie PD-1 gilt daher auch CTLA4 als negativ modulierendes Checkpoint-Molekül für die T-Zell-Aktivierung [20].

Ein weiterer Mechanismus zur Eindämmung autoreaktiver T-Zellen ist die Induktion regulatorischer T-Zellen [21]. Zum einen gibt es die aus dem Thymus stammenden regulatorischen T-Zellen (Treg), die sogenannten natürlichen Treg (nTreg), die sich durch besondere Affinitäten ihrer TCRs auszeichnen. Ihnen gegenüberstellen kann man die *induced* Treg (iTreg), welche als naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Thymus verlassen [22] und anschließend ihren Reifungsprozess beginnen. nTreg werden im Thymus durch Zellkontakt mit APC auf bestimmte Antigene geprimt [22]. Bei iTreg findet dieser Prozess nicht im Thymus, sondern

erst in der Peripherie [22] in den sekundären lymphatischen Organen über Zytokine, wie IL-10 [23], TGF- $\beta$  [22] oder IL-4 [24] statt.

Sowohl murine als auch humane nTregs lassen sich durch den Phänotyp: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> charakterisieren [25]. Humane nTregs werden außerdem durch die niedrige Expression von CD127, den IL-7-Rezeptor [26], gekennzeichnet und die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors, der CD25, CD122 und CD132 umfasst [21]. Das auf humanen und murinen nTreg exprimierte FOXP3 stört unter anderem die Wechselwirkung von AP-1 [27] und NFAT mit dem Promotor des IL-2-Gens [28]. IL-2 ist ein wichtiges  $\alpha\beta$  T-Zellen aktivierendes Zytokin [29]. Über die Expression des gegenüber IL-2 stark empfänglichen Rezeptor (IL2R) auf Treg wird die sogenannte IL-2 Starvation erzielt [30]. Das heißt, T-Helferzellen werden ausgehungert, da der IL2R der nTregs das unter limitierten Bedingungen vorhandene IL-2 abfischt [31, 32].

Treg tragen so zur Immunsuppression bei, die das Wachstum von Tumoren fördert, da das Immunsystem in seiner Anti-Tumor-Effektivität gestört wird. Woo et al. zeigten unter anderem, dass bei Patienten mit Non-Small-Cell-Lung-Cancer (NSCLC) und Patienten mit Ovarial-Karzinomen eine erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg im Vergleich zu den gesunden Probanden vorlag [33]. Zum gleichen Schluss kamen auch Saito et al. bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. Sie konnten bei einer der Patienten-Kohorten bei der nur wenige FoxP3<sup>+</sup> Treg vorhanden waren, auch eine Korrelation zwischen verlängertem Überleben und Anzahl der Treg mit Hilfe der Meyer-Kaplan-Kurve aufzeigen [34].

Treg können auf ihrer Oberfläche Rezeptoren wie CTLA-4 tragen und so ihre immunsuppressive Wirkung gegenüber T-Zellen entfalten [35]. Takahashi et al. zeigten, dass CTLA-4-Antikörper durch Unterdrückung regulatorischer T-Zellen zu einem histologischen Bild ähnlich einer Autoimmun-Gastritis mit vermehrtem Einstrom von Monozyten ins Gewebe führten [35].

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Untergruppe von T-Zellen, die bisher für ihre anti-tumoralen Eigenschaften bekannt ist: den  $\gamma\delta$  T-Zellen. Diese können unter bestimmten Stimulationsformen regulatorische, immunsuppressive Eigenschaften erlangen, die so effizient sind wie die suppressiven Eigenschaften der  $CD4^+CD25^+$  nTreg [36].

### 1.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Humane T-Zellen können anhand des Aufbaus ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) in zwei große Populationen unterteilt werden. Den größten Anteil nehmen T-Zellen ein, die einen Rezeptor mit einer alpha- und einer beta-Untereinheit besitzen: die sogenannten  $\alpha\beta$  T-Zellen. Einen geringeren Anteil von etwa 0,5-5% der T-Lymphozyten machen die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus, deren T-Zell-Rezeptor aus einer gamma- und einer delta-Untereinheit besteht [6].

Durch Kombination beider TCR-Ketten entstehen verschiedene  $V\gamma/V\delta$ -T-Zell-Rezeptor-Unterfamilien. Im Magen-Darm-Trakt, in der Haut oder der Lunge, d.h. in den Schleimhäuten und Epithelien, besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem einen  $\gamma\delta$ -TCR, der eine  $V\delta 1$ -Kette trägt [37, 38]. Etwa 50-90 % der peripheren  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimieren einen  $V\gamma 9\delta 2$ -TCR und machen somit den größten Teil der  $\gamma\delta$  T-Zellen im peripheren Blut aus [4]. Die peripheren  $\gamma\delta$  T-Zellen unterscheiden sich von den gewebständigen  $\gamma\delta$ -T-Zellen, da ihr  $V\gamma 9\delta 2$ -TCR praktisch identisch bzw. invariant ist, während der TCR der gewebständigen  $V\delta 1$  T-Zellen sich durch Kombination mit einer Vielzahl unterschiedlicher  $\gamma$ -Ketten auszeichnet [38, 39]. Interessanterweise weisen gewebständige  $\gamma\delta$  T-Zellen eine organspezifische Kombination ihrer  $\gamma$ -Kette auf, so zum Beispiel  $V\gamma 4$  im Epithel des menschlichen Darms [40].

$\gamma\delta$  T-Zellen zeigen an ihrer Oberfläche neben dem TCR unterschiedliche (Ko-)Rezeptoren, die zu ihrer Stimulation beitragen. Hierzu zählen zum Beispiel der Natural-Killer-Group-2-Member-D- Rezeptor (NKG2D) [41], der bestimmte Proteine (z.B. MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A (MICA), MHC Class I Polypeptide-Related Sequence B (MICB)) genauso wie UL16-binding-Proteine (ULBP1-4) erkennen kann, die von Zellen an deren Oberfläche präsentiert werden, wenn sie sich in einem infizierten, gestressten oder veränderten Zustand

befinden [37, 42]. Diese Oberflächenproteine, also zum Beispiel ULBP, die von gestressten, körpereigenen Zellen präsentiert werden, können von  $\gamma\delta$  T-Zellen über ihren NKG2D-Rezeptor oder vom  $\gamma\delta$ -TCR direkt erkannt werden [37].

Weitere Oberflächenmarker mit denen  $\gamma\delta$  T-Zellen sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen können, sind Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Durch die Stimulation eines TLR (TLR1-10) durch PAMPs und gleichzeitiger TCR-Stimulation kommt es zu einer Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen [43]. Genauso wurde auch eine TCR-unabhängige, Zytokinvermittelte Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen durch TLR-Liganden durch z.B. die Aktivierung INF- $\gamma$ -produzierender dendritischer Zellen (DC) beschrieben [44]. In einer positiven Feedback Reaktion produzieren  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit PAMPs INF- $\gamma$  [44].

Darüber hinaus exprimieren  $\gamma\delta$  T-Zellen sogenannte NOTCH-Rezeptoren (u.a. NOTCH 1 und NOTCH 2). Humane NOTCH-Rezeptoren werden aktiviert durch Interaktion mit ihren Liganden der Serrate Familie z.B. JAGGED-1 und JAGGED-2 sowie Liganden der Delta-Familie (DII1, DII3, DII4) [45]. Die Expression von NOTCH-Rezeptoren, z.B. nach Stimulation mit IL-2 und Bisphosphonaten steigert unter anderem das zytotoxische Potential von  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenso wie die Produktion verschiedener Zytokine wie INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17 der  $\gamma\delta$  T-Zellen [46]. Außerdem ist der NOTCH-Pathway an der Differenzierung und Entwicklung von sowohl  $\alpha\beta$  als auch  $\gamma\delta$  T-Zellen beteiligt [47].

Eine weitere Form der Aktivierung stellt die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität dar (ADCC). CD16, was vor allem auf V $\delta$ 2-negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert wird, kann zu einer TCR-unabhängigen zytotoxischen Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen führen [48]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei chronisch an Malaria Erkrankten, die typischerweise ein erschöpftes  $\gamma\delta$ -T-Zellkompartiment aufweisen,  $\gamma\delta$  T-Zellen allein durch Stimulation des Rezeptors CD16 zytolytische Funktion ausüben können, während die  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten des TCR herabreguliert waren [49].

Die Besonderheit bei  $\gamma\delta$  T-Zellen liegt unter anderem auch darin, dass ihre Funktionen sich nicht vollständig dem adaptiven oder dem angeborenen Teil des

Immunsystems zuordnen lassen, da  $\gamma\delta$  T-Zellen Kriterien und Funktionen beider Untergruppen erfüllen [9, 42].  $\gamma\delta$  T-Zellen können bei einer Infektion in großer Anzahl aktiviert werden, was ihre Zuordnung in die Untergruppe des angeborenen Immunsystems unterstreicht [42, 50].

$\gamma\delta$  T-Zellen haben als Bestandteil des angeborenen Immunsystems den Vorteil, sehr schnell auf Infektionen oder Stress reagieren zu können, da sie ihre nicht-peptidischen Antigene unabhängig von einer Präsentation durch einen MHC erkennen können. Daher tragen über 75 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche [7, 51], die Moleküle auf einer  $\alpha\beta$  T-Zelle, die mit MHC-I oder MHC-II-Molekülen bei der Antigen-Erkennung interagieren. Da  $\gamma\delta$  T-Zellen diese nicht auf ihrer Oberfläche tragen, unterstreicht dies ihre MHC-unabhängige Antigenerkennung

$\gamma\delta$  T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der initialen Immunantwort auf viele Erreger, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* [52, 53, 54], *Mycobacterium leprae* [55], Leishmanose [56, 57] und *Listeria monocytogenes* [58]. Nach Infektion durch die Erreger kommt es zu einem rapiden Anstieg der  $\gamma\delta$ -T-Zell-Anzahl im peripheren Blut [52, 57, 58]. Ferrick et al. vermuteten  $\gamma\delta$  T-Zellen als eine der Hauptquellen für  $\text{INF}\gamma$  und damit einen Zusammenhang mit der Rekrutierung von Makrophagen nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* [59].  $\gamma\delta$  T-Zellen spielen außerdem eine Schlüsselrolle in der Initiation und der Beendigung der Immunantwort durch Immunsuppression [36, 37, 60], und können in pathophysiologischen Zuständen die Progression von Tumorerkrankungen fördern [1]. Laut Zhao et al. können sich je nachdem durch welche Zytokine sie stimuliert werden,  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einem Anti-Tumor-Effekt entwickeln, oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die eher tumorfördernd agieren, wie z.B.  $\gamma\delta$ -T17-Zellen oder  $\text{FoxP3}^+$ Treg [6].

IL-18, IL-23 und IL-1 $\beta$  induzieren eine Differenzierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen zu  $\gamma\delta$ -T17 Zellen.[61-63] Diese Zytokine waren bei Patienten mit Gallenblasen-CA ebenso erhöht wie die Anzahl an  $\gamma\delta$ -T17-Zellen im peripheren Blut und der Tumorumgebung [63]. IL-17 spielt unter anderem eine Rolle in der Pathophysiologie und bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie

Psoriasis oder multipler Sklerose [64], genauso wie in der Abwehr bestimmter Erreger, wie z.B. *Toxoplasma gondii* [62]. IL-17 induziert außerdem die Reifung von Neutrophilen und ihre Ausschwemmung aus dem Knochenmark und ist dadurch ein entscheidender Faktor im Anfangsstadium einer Entzündungsreaktion [50]. Wakita et al. zeigten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen, die Tumore infiltrierten, über Produktion von IL-17 zu einer Förderung des Tumorstwachstums führten, indem sie einen fördernden Einfluss auf die Tumorangio-genese durch Stimulation der Angiogenesefaktoren VEGF und Angiotensin 2 hatten [65]. Auch Patil et al. zeigten, dass die IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen einen tumorfördernden Einfluss auf Gallenblasenkarzinomzellen hatten [63]. Außerdem zeigte sich eine Korrelation zwischen der Höhe der IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen und des früheren Versterbens der Patienten [63].

Klinische Studien mit MS-Patienten zeigen hingegen, dass eine niedrige Anzahl an V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mit einer schlechteren klinischen Situation korreliert [66].  $\gamma\delta$  T-Zellen stellen damit in diesem Fall eine essenzielle Wächterfunktion des Immunsystems dar. Laut Casetti et al. induzieren IPP, IL-15 und TGF- $\beta$  in V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen einen suppressiven Immunphänotyp, der T-Zellantworten supprimiert [36]. V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen supprimierten hier aktivierte T-Zellen, die in vitro durch die Stimulation von PBMCs mit anti-CD3/anti-CD28 *beads* simuliert wurden [36]. Peters et al. zeigten, dass eine Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit TGF- $\beta$  im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Casetti et al. keinen supprimierenden Effekt hatte, sondern die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen erhöhte [67]. Gong et al. zeigten, dass HMBPP-aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen regulatorische Funktionen annehmen, indem sie die Proliferation IL-2 stimulierter, regulatorischer T-Zellen hemmen konnten [68]. Die Funktionalität von  $\gamma\delta$  T-Zellen scheint abhängig von ihrem sie umgebenden Zytokin-Milieu und ihrer Lokalisation zu sein, die beeinflussen, ob sie eine regulatorische Funktion ausüben werden, das heißt  $\alpha\beta$  T-Zellantworten supprimieren oder nicht [8, 63].

Während  $\gamma\delta$  T-Zellen auf der einen Seite eine immunsuppressive Funktion durch die Produktion von Zytokinen wie Interleukin-10 (IL-10) und Transforming-Growth-Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zugesprochen wird [60], produzieren sie in anderem Kontext auch Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) [4, 44, 48, 51, 60],

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [51] und IL-17 [69], die Entzündungsvorgänge im Körper vorantreiben. Eine Entwicklung von  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl zu Zellen mit TH1-Profil als auch zu Zellen mit TH2-Profil ist möglich, je nachdem produzieren sie Zytokine wie INF $\gamma$  (TH1) oder IL-4 bzw. IL-6 (TH2) [70-72]. Ebenso wichtig ist die Produktion von Proteinen wie Perforin [73] und Granzyme B [73] durch  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche eine wichtige Funktion bei der Induktion von zytolytischen Prozessen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen haben, indem sie die Zellmembran angreifen, Poren bilden und die Zellen dadurch letztendlich zu Grunde gehen.

$\gamma\delta$  T-Zellen können außerdem potent Antigene präsentieren [41] und hierbei teilweise sogar potenter als antigenpräsentierende Zellen (APC) gegenüber CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fungieren [74].

Die Beispiele aus der Literatur über  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigen eindeutig: Das Spektrum an Fähigkeiten von  $\gamma\delta$  T-Zellen ist vielseitig [42].

#### **1.4 V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen**

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen, die, wie oben bereits beschrieben, den Großteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen im peripheren Blut ausmachen.

#### **1.5 TCR-abhängige Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen**

V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen werden unter anderem über ihren TCR durch Phosphoantigene, wie Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) indirekt aktiviert [75, 76].

Die beim Mevalonatsyntheseweg aus Acetyl-CoA entstehenden Isoprenoide, werden im Anschluss zur Synthese von Cholesterol verwendet [77]. Hingegen entstehen die Phosphoantigene im Nicht-Mevalonat-Syntheseweg oder auch DOXP-/MEP-Pathway nicht aus Acetyl-CoA, sondern aus einer Verknüpfung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat [77]. Der Mevalonat-Syntheseweg ist ein stark konservierter physiologischer Pathway sowohl in eu- als auch in prokaryotischen Zellen, während der „Nicht-Mevalonat“-Pathway in Pathogenen zu finden ist [78].

Im Rahmen einer Infektion oder einer Tumorerkrankung kommt es durch vermehrte Proliferation und Effektorfunktion zur intrazellulären Akkumulation

dieser Phosphoantigene, was es den V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen ermöglicht, diese gestressten, veränderten Zellen zu erkennen und abzutöten [75].

(E-)4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-Pyrophosphat (HMBPP) ist ebenso wie IPP ein effektiver Aktivator von  $\gamma\delta$  T-Zellen [79, 80].

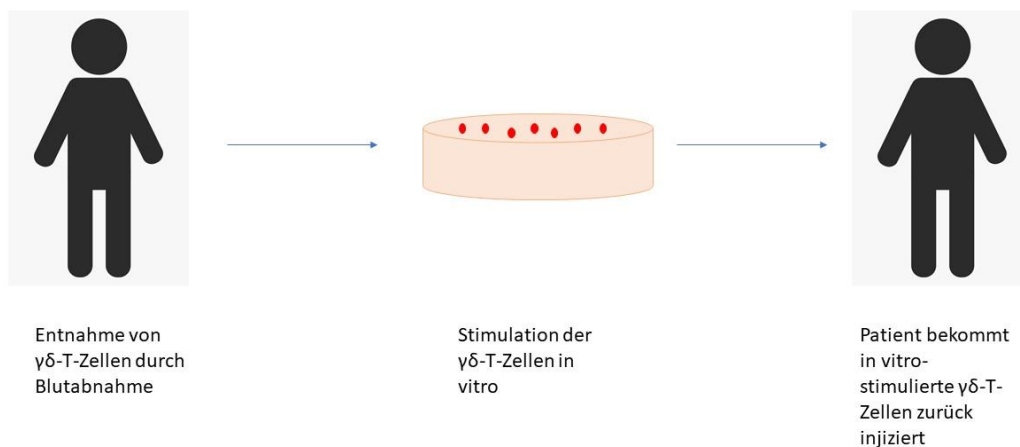
HMBPP wird als Zwischenprodukt des „Nicht-Mevalonat“-Pfades von bestimmten Pathogenen gebildet [42, 80]. HMBPP kann dann mit der B30.2 Domäne des BTN3A1 Membranproteins interagieren und induziert eine intrazelluläre Konformationsänderung von BTN3A1 [81]. Sebestyen et al. zeigten, dass die GTPase RhoB eine extrazelluläre Konformationsänderung von BTN3A1 an der Oberfläche von Tumorzellen bewirkt, sodass diese von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen diskriminierend erkannt und abgetötet werden können [82]. BTN3A1 ist zwar nicht, wie lange vermutet, ein TCR Ligand von V $\delta$ 2 T-Zellen, spielt aber durch seine Interaktion mit Liganden assoziierten Molekülen (BTN2A1) eine zentrale Rolle in der Aktivierung von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [83].

$\gamma\delta$  T-Zellen-aktivierende Phosphoantigene werden vermehrt von Körperzellen exprimiert, wenn deren Synthese gesteigert wird. Dies passiert zum Beispiel, wenn Körperzellen zu Tumorzellen transformiert und die Körperzellen dysreguliert sind und ungehindert proliferieren. Sie produzieren dann vermehrt Phosphoantigene (u.a. IPP), was zu einer vermehrten Bildung aktivierter TCR Liganden führt, die von  $\gamma\delta$  T-Zellen erkannt werden können [37]. In-vitro Versuche zur Tumorthherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen weisen darauf hin, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen eine essenzielle Funktion in Bezug auf das Tumorstadium, aber auch in Bezug auf Therapieformen von Tumoren haben [3, 7, 41, 84]. Zoledronat (ZOL) ist ein Bisphosphonat, welches in den Mevalonat-Syntheseweg eingreift, indem es das Enzym Farnesyl-Diphosphat-Synthase (FPP-Synthase) hemmt und so zu einer Akkumulation der vorgeschalteten Zwischenprodukte (z.B. IPP) führt [85]. Schilbach et. al zeigten, dass eine Stimulation von frisch-isolierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mit ZOL in vitro zu einer verstärkten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (U251 und SK-Mel-28) führte [84]. Genauso konnten auch mit ZOL inkubierte U251-Tumorzellen besser von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen erkannt und abgetötet werden [84]. Auch Nicol et. al zeigten in ihren in-vitro Versuchen mit V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen von

Patienten mit verschiedenen soliden Tumorentitäten, dass V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen eine starke Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen verschiedener Entitäten zeigten, nachdem sie in vivo mit ZOL-gepulst wurden [7]. Auch ihre Oberflächenmarker veränderten sich und sie zeigten in vitro eine vermehrte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 [7]. Bei Di Carlo et al. konnten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen, die von gesunden Spendern entnommen wurden, *in vitro* Neuroblastom-Tumorzellen abtöten, vor allem, wenn diese Tumorzellen vorher mit ZOL behandelt wurden [3]. Eine Behandlung mit ZOL führt dazu, dass vermehrt IPP von den Tumorzellen produziert wurde, welches V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen indirekt aktiviert [3]. Anschließend können  $\gamma\delta$  T-Zellen die Tumorzellen effizient erkennen und abtöten [3]. Auch Aehnlich et al. zeigten, dass Tumore eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen aufwiesen, wenn diese vorher mit ZOL behandelt wurden [86].

### **1.6 Adoptiver Immuntransfer**

Diese vielversprechenden in vitro Befunde sollten unbedingt in die Klinik übersetzt werden. Unterschiedliche Konzepte bestehen bereits dazu. Zum einen die in vivo Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit Bisphosphonaten, wie Zoledronat [7, 13, 87, 88] oder anderen Phosphoantigenen und zum anderen das Konzept des adoptiven Immunotransfer von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation in vitro (**Abbildung 1**) [2, 7, 10, 12]. Ein solcher Transfer ist ohne vorheriges „matching“ von Spender und Empfänger möglich, da  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht alloreaktiv sind [89].



**Abbildung 1: Immuntransfer mit in-vitro Zell-Stimulation**

Wie zahlreiche Studien bereits zeigten, sind in vitro stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen sehr gut verträglich und nicht mit schweren Nebenwirkungen assoziiert [7, 11, 13], allerdings zeigte sich bisher nur kein bis sehr wenig therapeutischer Erfolg nach in-vitro Stimulation und anschließendem Transfer (im Verlauf auch als „ex-vivo Stimulation“ bezeichnet). Bei Kobayashi et al. zeigten 2007 in einer Studie mit Patienten mit Nierenzellkarzinom (RCC) und ex-vivo Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit 2-Methyl-3-Butenyl-1-Pyrophosphat (2M3B1-PP) - Antigen alle der sieben Patienten nur schwache Nebenwirkungen (< Grad 3) durch die Therapie in Form von Transaminasenerhöhungen, Diarrhoe, Fieber und Fatigue [2]. Gleichzeitig sprachen aber auch nur 3 von 5 Patienten auf die Therapie an, in dem sich die Zellverdopplungszeit des Tumors in der Bildgebung verlängerte [2]. Allerdings waren in keinem Fall Remissionen zu verzeichnen [2]. In einer neueren Phase I/II-Studie von Kobayashi aus dem Jahr 2011, in der ebenfalls Patienten mit metastasiertem RCC mit ZOL-gepulsten  $\gamma\delta$  T-Zellen behandelt wurden, zeigte einer der 11 Patienten eine komplette Remission (CR), während 5 Patienten eine stable disease (SD) und 5 Patienten eine progressive disease (PD) zeigten [13]. Leichte Nebenwirkungen zeigten sich in Form von Fieber und Fatigue bei allen Patienten der Studie [13]. Schwerere Nebenwirkungen in Form von Lymphopenie, Neutropenie und Veränderungen der Transaminasen und des Kreatinins zeigten sich vor allem in den ersten Zyklen und nahmen im Laufe der Behandlung ab [13].

Ebenso zeigten andere Studien, in denen Patienten mit Zoledronat behandelt wurden keine überzeugende antitumorale Wirkung. Nicol et al. zeigten in einer Phase-I klinischen Studie bei Patienten verschiedener, solider Tumorentitäten (u.a. Melanom, Mammakarzinom, Kolonkarzinom, etc.), dass eine Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit Zoledronat in vivo, mit anschließender in-vitro Expansion und Transfer, lediglich bei 3 Patienten zu einer SD führten und sich bei 12 Patienten sogar Tumorprogression unter Therapie mit V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen und Zoledronat-Stimulation einstellte [7]. Nur bei 2 Patienten konnte ein partieller Rückgang (PR) des Tumorwachstums aufgezeigt und bei einer Patientin mit Mamma-Karzinom eine komplette Remission erzielt werden [7]. Allerdings erhielten letztere Patienten auch zusätzlich zur adoptiven  $\gamma\delta$ -T-Zell-Therapie weiterhin ihre vorherigen anderen Therapien [7]. Kunzmann et al. zeigte zunächst nach in-vitro Stimulation und Transfer eine Reduktion von Tumorzellen bei Patienten mit Multiplem Myelom nach Stimulation mit Aminobisphosphonaten wie z.B. Pamidronat [10]. In einer Studie von 2012 untersuchten sie dann bei verschiedenen Tumorentitäten (AML, metastasiertes RCC und metastasiertes MM) das zytotoxische Potential von ZOL und IL-2- stimulierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Auch hier zeigte von den 21 untersuchten Patienten nur ein Patient eine PR und 6 Patienten eine SD, während die anderen Patienten eine PD aufwiesen [11].

Während der Therapie zeigten sich bei Nicol et al. wie bei Kunzmann et al. allerdings kaum und nur sehr kurzzeitige Nebenwirkungen (< 24h) wie etwa Fieber [7, 11].

Bennouna et al. verabreichten in ihrer Studie Patienten mit Nierenzellkarzinom V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in Form einer Innacell  $\gamma\delta^{\text{TM}}$ -Infusion, die im Durchschnitt etwa 76%  $\gamma\delta$  T-Zellen enthält [5]. Zusätzlich erhielten die Patienten noch zeitgleich mit der Infusion IL-2 intravenös [5]. Auch hier zeigten sich keine überzeugenden klinischen Resultate nach adoptiver Therapie, was auch daran liegen kann, dass sich alle Patienten bereits in einem sehr fortgeschrittenen Stadium ihrer Krebserkrankungen befanden und die herkömmlichen Therapieformen bereits ausgeschöpft waren [5].

Nakajima et al. zeigten bei Patienten mit NSCLC durch adoptiven Immuntransfer ex vivo mit ZOL und IL-2 stimulierter V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen 4 Wochen nach Gabe der letzten T-Zell-Infusion bei den Patienten weder eine Teilremission noch eine Vollremission [12]. Bei 3 Patienten stellte sich eine SD ein und bei 5 der Patienten zeigte sich sogar eine Tumorprogression [12].

Meraviglia et al. untersuchten die zytotoxische Effektivität von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen, die mit ZOL und IL-2 in vivo stimuliert wurden, bei Patientinnen mit Brustkrebs [87]. Von 5 Patientinnen zeigte eine Patientin nach 9 Monaten Therapie eine PR, 2 Patientinnen eine SD und eine Patientin eine PD [87].

Dieli et al. stimulierten in vivo  $\gamma\delta$  T-Zellen mit ZOL plus/minus adjuvantem IL-2. In der Gruppe der Patienten, die nur mit ZOL behandelt worden waren, zeigte einer der 9 Patienten eine PR, ein Patient eine SD und die anderen 7 eine PD [88]. In der Kohorte der mit ZOL und IL-2 behandelten Patienten wiesen 2 der 9 Patienten eine PR auf, 4 Patienten eine SD und 3 Patienten eine PD [88]. Hier konnte sich bei den Patienten eine Korrelation zwischen der Anzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen und einem outcome der Therapie nach 12 Monaten verzeichnen lassen [88]. Patienten mit hoher Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten ein besseres outcome nach Therapie [88]. Insgesamt zeigten sich bei den Studien also enttäuschende Ergebnisse.

Die oben genannten Studien zeigen, dass die Therapieform des adoptiven Immunotransfers zwar nebenwirkungsarm ist, auf der anderen Seite aber auch nicht effektiv. Zhao et al. beschreiben in den von Ihnen metaanalysierten klinischen Studien nur eine durchschnittliche Antwortrate auf  $\gamma\delta$ -T-Zell-Immuntherapie von 21 % (Antwortrate = (Komplettremission + Teilremission) / „number of evaluable patients“) [6]. Sowie einen transienten klinischen Benefit von nur 57% [6]. Dieser setzt sich zusammen aus Komplettremission + Teilremission + „stable disease“) / „number of evaluable patients“ [6].

Angesichts der Tatsache, dass parallel zur adoptiven oder in vivo stimulierenden Immuntherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen teilweise zusätzlich konventionelle Therapien fortgeführt werden, muss jeglicher, positiver Effekt kritischer betrachtet werden [7].

## 1.7 TCR-unabhängige Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Skeen und Ziegler beschrieben bereits 1995, dass die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht allein durch direkte TCR-Signale gesteuert werden kann [90]. Nach Blockierung des TCR durch einen Antikörper konnten  $\gamma\delta$  T-Zellen weiterhin durch Zytokine stimuliert werden, was darauf schließen lässt, dass diese Zytokine (z.B. IL-12) eine TCR-unabhängige Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen auslösen [90]. Außerdem zeigten Skeen und Ziegler ebenfalls, dass eine Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen durch IL-12 zu einer Produktion von INF- $\gamma$  führt [90].

Domae et al. beschrieben eine TCR-unabhängige Aktivierung von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen durch die Zytokine IL-12 und IL-18, auch bezeichnet als „TCR bypass“-Stimulation aufgrund seiner potenten Wirkung [91]. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit diesen beiden TH1 polarisierenden Zytokinen konnte bei V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen eine erhöhte Produktion von INF- $\gamma$  induziert werden [91]. Außerdem führte eine Kombination der beiden Zytokine auch zu einer vermehrten Proliferation von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt [91]. IL-15 und IL-2 wurden in diesem Experiment zusätzlich zu IL-12 und IL-18 zugegeben und führten zu einer vermehrten Proliferation im Vergleich zur kombinierten Gabe von IL-12 und IL-18 [91]. Domae et al. konnten außerdem aufzeigen, dass eine Aktivierung von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen durch IL-12 und IL-18 in Kombination zu einem erhöhten zytotoxischen Potential gegenüber Myelom-Tumorzellen in vitro führte [91].

Schilbach et al. zeigten, dass die Stimulation mit IL-2, IL-12 und IL-18 eine erhöhte Produktion von INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch  $\gamma\delta$  T-Zellen bewirkte, die durch ein zusätzliches TCR-Signal noch etwas verstärkt wurde [71]. Ebenso erhöhte die bypass-Stimulation die Anzahl NKG2D+  $\gamma\delta$  T-Zellen [71].

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine und ihre allgemeinen Funktionen findet sich in **Tabelle 1**.

**Tabelle 1: In den Experimenten verwendete Zytokine und ihre allgemeinen Funktionen**

<b>Zytokin</b>	<b>Funktion</b>
IL-2	<i>Spielt eine Rolle in der Proliferation von B- und T-Lymphozyten</i>
IL-7	<i>Spielt eine Rolle in der Entwicklung von Lymphozyten, ist das zentrale Interleukin, das das Überleben der gesamten Hämatopoese maßgeblich gewährt und die Homöostase steuert.</i>
IL-12	<i>Proinflammatorisches Zytokin, induziert eine TCR-unabhängige T-Zell-Aktivierung, die zu einer Produktion von INF-<math>\gamma</math> führt, induziert eine TH1-getriebene Immunreaktionen [92]</i>
IL-15	<i>T-Zell- und NK-Zell-Aktivierung und Proliferation, hat als Zytokin viele Gemeinsamkeiten mit IL 2</i>
IL-18	<i>Proinflammatorisches Zytokin, bekannt für die TH1 Aktivierung von natürlichen Killerzellen, steigert die INF-<math>\gamma</math>-Produktion in TH1-Zellen</i>

### **1.8 PD-1-/PD-L1-Interaktion**

PD-1 (*programmed death-1*) und PD-L1 (*programmed death- ligand 1*) sind Rezeptoren auf Oberflächen von aktivierten Immunzellen, wie zum Beispiel B-Zellen [17, 93, 94], NK-Zellen [94], Monozyten [93], CD4<sup>+</sup> T-Zellen [17, 93, 94] und CD8<sup>+</sup> T-Zellen [17, 27, 93, 94]. PD-1, ein Mitglied der CD28-Familie, gilt bei Ligandenbindung als negativ inotrop stimulierender Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen und reguliert ihre Aktivierung [27]. PD-1-Stimulation durch Interaktion mit seinen Liganden führt zur Induktion von T-Zell-Anergie und vermindert die IL-2- Produktion der T-Zellen [27, 93]. Wenn PD-1 als Oberflächenmolekül fehlt, z.B. bei PD-1-negativen Mäusen, kommt es zur unkontrollierten Entwicklung von Autoimmunerkrankungen durch unkontrollierte

Proliferation von T-Zellen [95]. Ein Ligand für den PD-1-Rezeptor ist PD-L1 (B7-H1), ebenso wie PD-L2 (B7-DC) [94, 96], welche beide Mitglieder der B7-Familie sind [93]. PD-L1 wird auf B-Zellen [94, 97], dendritischen Zellen [94, 97], Makrophagen und Mastzellen, ebenso wie auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg-Zellen exprimiert [94]. PD-L1 interagiert nicht nur mit PD-1, sondern auch mit CD80 [96]. Eine Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 [27, 97] genauso wie eine Interaktion zwischen PD-L1 und CD80 [96] führt zu einer Induktion von Anergie bei T-Zellen, was insgesamt einen immunsuppressiven Effekt zur Folge hat. Die Expression von PD-L1 fungiert unter anderem als Schutzmechanismus gegen autoreaktive T-Zellen in Autoimmunprozessen [93, 94]. Eine Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 führt zu einer verminderten Produktion von Zytokinen, wie zum Beispiel INF- $\gamma$ , IL-10 und IL-2 [97], wohingegen eine Blockade der Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine führt [94]. Bei TCR-Stimulation und/oder Infektionen durch Erreger kommt es zu einer Hochregulation der PD-1 Rezeptoren auf T-Zellen. Eine Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion führt in diesem Fall zu einer verbesserten Immunreaktion des Körpers auf Infektionen [94].

PD-1 und PD-L1 werden auch als sogenannte *Immunocheckpoints* bezeichnet [94]. Durch die Interaktion zwischen PD-L1 auf Tumorzellen und PD-1 auf T-Zellen können Tumorzellen eine Aktivierung dieser Zellen verhindern. Es wird vermutet, dass INF- $\gamma$ , welches von T-Zellen nach Kontakt zu Tumorantigenen produziert wird, zu einer Hochregulation der Expression von PD-L1 auf Tumorzellen führt [96, 97]. Diese können durch vermehrte PD-L1-Expression dem Immunsystem entkommen und unkontrolliert wachsen. (**Abbildung 2**) Dieser Vorgang wird auch als *immune escape* bezeichnet. Der Mechanismus des *immune escape* von Tumorzellen durch PD-1/PD-L1-Interaktion beinhaltet u.a. die Produktion des antiinflammatorischen IL-10, Induktion der T-Zell-Anergie und T-Zell-Apoptose, genauso wie die Induktion von iTreg [96].

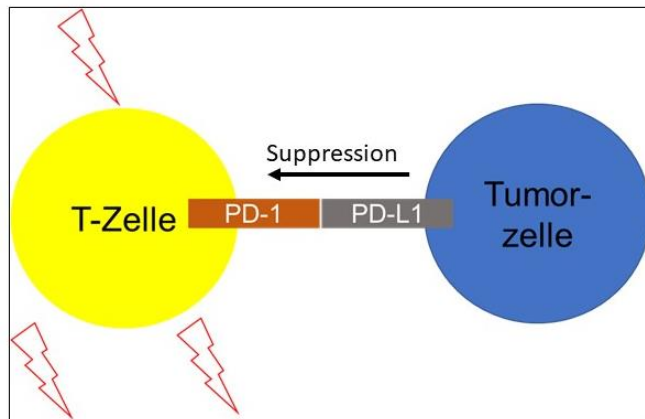
PD-L1-Expression auf Tumorzellen verschiedener Entitäten (z.B. non-small-cell-lung-cancer (NSCLC), Mammakarzinomen oder auch Nierenzellkarzinom) wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen und korrelierte oft mit einem besseren klinischen outcome bei Patienten mit höherer PD-L1-Expression, was den

Einfluss des PD-1/PD-L1-Pathway auf die Interaktion zwischen Tumorgewebe und Immunsystem bestätigt [98-100]. Thompson et al. wiesen nach, dass Lymphozyten in unmittelbarer Tumorumgebung ebenfalls eine erhöhte Expression von PD-L1 zeigten, was eine Fähigkeit dieser Lymphozyten zur tumorfördernden Unterdrückung des Immunsystems vermuten lässt, die erhöhte Expression von PD-L1 auf den den Tumor umgebenden Lymphozyten korrelierte ebenfalls mit einem schlechteren outcome [100].

In aktuellen Krebstherapien werden daher PD-1- und PD-L1-Antikörper eingesetzt, die die Interaktion zwischen diesen beiden Oberflächenmolekülen verhindern können. Diese Antikörper werden als Immunocheckpoint-Inhibitoren bezeichnet. Einer der ersten und wohl bekanntesten Immunocheckpoint-Inhibitoren ist Nivolumab. Nivolumab ist ein monoklonaler Antikörper (mAB) gegen das Oberflächenmolekül PD-1. Er findet unter anderem Einsatz bei Therapien des Melanoms, Lungenkarzinoms und Nierenzellkarzinoms [96].

Nachdem Peters et al. aufzeigen konnten, dass frisch isolierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen *responder*-T-Zellen in Co-Kultur supprimierten, untersuchten sie, inwieweit PD-L1 und PD-1 als Oberflächenmoleküle bei diesem Vorgang eine Rolle spielen [101]. Sie konnten zeigen, dass *responder*-T-Zellen in Co-Kultur mit V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen PD-L1 erhöht exprimierten und, dass durch Antikörper-Blockade mit anti-PD-L1 die Suppression der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen reversibel war [101]. Außerdem konnte nur bei direktem Zell-Zell-Kontakt eine Proliferationsunterdrückung durch V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nachgewiesen werden [101]. Dies weist daraufhin, dass eine Hochregulation von PD-L1 auf aktivierten V $\delta$ 2- $\gamma$  $\delta$  T Zellen und PD-1 auf den Target-Zellen eine wichtige Rolle in der Suppression körpereigener Zellantworten spielt [101].

Auch Daley et al. befassten sich bereits mit der Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1 in einem Model mit pankreatischen Adenokarzinomzellen [1]. Zunächst zeigten sie auf, dass durch eine Deletion der  $\gamma$  $\delta$  T-Zellen die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen erhöht werden konnte [1]. Sie konnten außerdem nachweisen, dass anti-PD-L1-Antikörper die Suppression von  $\alpha$  $\beta$  T-Zellen durch, den Tumor infiltrierende,  $\gamma$  $\delta$  T-Zellen aufheben konnten [1].



**Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung zur Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 im Tumorkontext [96]**

Durch die Interaktion zwischen PD-1 auf der T-Zelle und PD-L1 auf der Tumorzelle wird die Funktion der T-Zelle gestört. Der Tumor kann sich dadurch vor dem Immunsystem „verstecken“. Dieses Phänomen nennt man auch *immun escape*.

Die oben genannten Studien weisen darauf hin, dass PD-1/PD-L1- Interaktion eine große Rolle spielt bei der Suppression von  $\alpha\beta$ -T-Zellantworten durch  $\gamma\delta$  T-Zellen. Durch Klärung, aufgrund welcher Stimulationsformen es bei  $\gamma\delta$  T-Zellen zu einer PD-L1 Expression kommt, könnten Therapien wie adoptiver Immunotransfer daher wirksam gemacht werden.

## 1.9 Fragestellung

- (1) Resultiert die suppressive Aktivität von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen aus TCR vermittelter Stimulation oder können ex vivo negativ-isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen bzw. IL-12, -15 und -18 stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen autologe  $\alpha\beta$  T-Zellen in ihrer Proliferation supprimieren und/oder besitzen sie das Potential Apoptose bei autologen CD3/CD28 aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen auszulösen? Dies könnte ein Faktor sein, der dazu führt, dass bisher die Krebstherapien mit  $\gamma\delta$  T-Zellen noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern.
- (2) Werden die Oberflächenmarker PD-1 und PD-L1 auf frisch negativ-isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen beziehungsweise IL-12,-15 und -18 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert?
- (3) Korreliert die Expression der Oberflächenmarker PD-1 und PD-L1 auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mit ihrem Potential, die Proliferation von autologen CD3/CD28 aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen zu unterdrücken bzw. bei autologen CD3/CD28 aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen Apoptose zu induzieren?

## 2 Material und Methoden

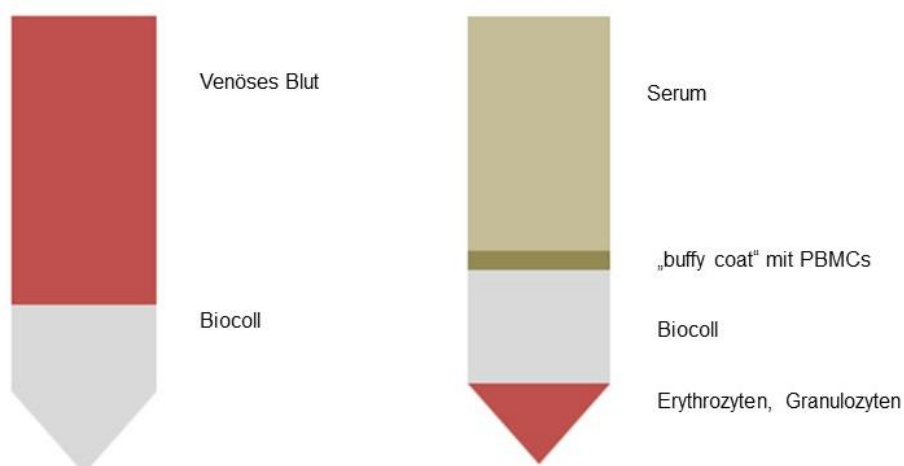
### 2.1 Probanden, Vorbereitung, Blutentnahme

Das für die Experimente verwendete Vollblut wurde von gesunden, freiwilligen und zufällig ausgewählten Probanden gespendet.

Zu Beginn werden jedem der Spender etwa 100-120 ml peripheres, venöses Blut in einer, mit Heparin (Heparin-Natrium-25.000-Injektionslösung, 25.000 Injektionseinheiten, Ratiopharm) gespülten Spritze entnommen, um anschließend die peripheren mononukleären Blutzellen zu isolieren und weiterzuverwenden.

### 2.2 Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Isolation

Das Blut wird mit Phosphate-Buffered Saline (Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS), Sigma, Katalognr.: D8537) im Verhältnis 1:1 verdünnt und mit Hilfe von Ficoll (Biocoll separating solution, buffered with 10mM HEPES, Biochrom GmbH, Katalognr.: L6113) in einer Zentrifuge durch Dichtegradientenzentrifugation in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Zwischen Serum und Ficoll befindet sich der „*buffy coat*“, der die Leukozyten enthält. (**Abbildung 3**)



**Abbildung 3: PBMC Isolation vor und nach Dichtegradientenzentrifugation**

Dieser wird mithilfe einer Pipette aufgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die verbliebenen Erythrozyten mithilfe eines

Lyse-Puffers eliminiert, indem sie etwa eine Minute mit ca. 1 ml Lyse-Puffer (BD Pharm Lyse™, BD Bioscience, Katalognr.: 555899) inkubiert werden. Der Lysepuffer wird 1:10 mit sterilem Wasser (sterile-filtered water, suitable for cell culture, Sigma, BioReagent, Katalognr.: W3500) verdünnt. Dann werden die Zellen wieder mit PBS aufgefüllt, ein letztes Mal zentrifugiert und in RPMI-Medium aufgenommen. Das Medium setzt sich zusammen aus RPMI 1640 (RPMI 1640 Medium, Biochrom, Katalognr.: F1215), L-Glutamin (15 ml), Penicillin-Streptomycin (P/S) (50 ml) und fetalem Kälberserum (FBS 10%, heat-inactivated, Biochrom, Katalognr.: F1215) (15 ml). Es werden 2 µl Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau (Trypan Blue Solution, 0,4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture, Sigma, Katalognr.: T8154) verdünnt. Ca. 10 µl der verdünnten Zelloösung werden mithilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt und mit folgender Formel berechnet:

**Formel 1: Formel für das Zählen von Zellen unter dem Mikroskop mithilfe der Neubauerzählkammer**

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl der Zellen in allen vier Quadranten}}{4} * 10^4 * \text{Verdünnung der Zellsuspension} = \frac{\text{Zellzahl}}{x \text{ [ml]}}$$

## 2.3 Negative γδ-T-Zell-Isolation (untouched)

Die negative Isolation der γδ T-Zellen wird mithilfe des *EasySep human γδ-T-cell-Isolation-Kit* und einem *customized isolation cocktail* von *Stemcell technologies* (EasySep™ Human Gamma Delta T Cell Isolation Kit, Stemcell Technologies, Katalognr.: 19255) oder mithilfe des *TCR γδ-Isolation-Kit, human* von *Miltenyi Biotec* (TCRγδ<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit human, Miltenyi Biotec, Katalognr.: 130-092-892) durchgeführt.

### 2.3.1 *EasySep human γδ-T-cell-Isolation-Kit [STEMCELL]*

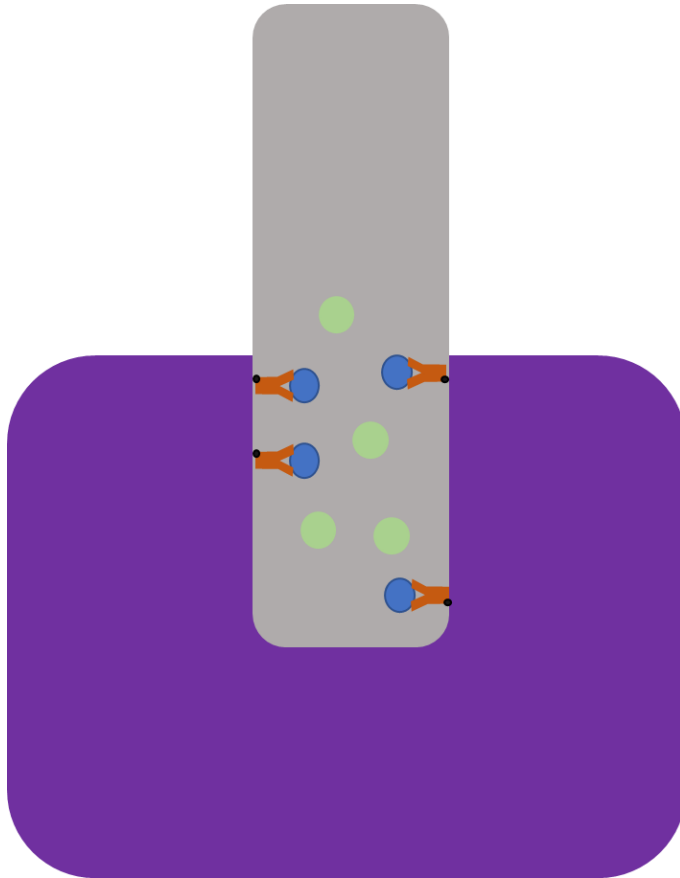
Der Antikörper-Cocktail (EasySep™ Human Gamma/Delta T Cell Isolation Cocktail, Stemcell Technologies, Katalognr.: 19255C) des *EasySep human γδ-T-cell-Isolation-Kit* von *Stemcell technologies* muss für diese Experimente in der Zusammensetzung verändert werden, da er den Antikörper zu dem Oberflächenmarker CD16 enthält, der auch auf der Zelloberfläche von γδ T-

Zellen zu finden ist. Daher findet sich in unserem custom made  $\gamma\delta$  T cell untouched isolation kit Antikörper-Cocktail kein anti-CD16-AK mehr, um die Gesamtheit an  $\gamma\delta$  T-Zellen zu isolieren. Auch das handelsübliche Protokoll des Isolations-Kits wurde leicht verändert, um die Ausbeute an  $\gamma\delta$  T-Zellen zu erhöhen. Das Protokoll wird im Folgenden detailliert beschrieben.

Als Grundlage für die negative Isolation werden frisch isolierte PBMCs verwendet, die wie in Abschnitt 2.2. isoliert werden. Diese werden mit einer Konzentration von  $5 \cdot 10^7$  Zellen pro Milliliter in dem empfohlenen Medium [ $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  freies PBS, 2% fetal bovine serum (FBS), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)] aufgenommen. Anschließend werden sie in ein *Fluorescence-activated-cell-sorting*-Röhrchen (FACS) überführt. Zur Zellsuspension werden nun 50  $\mu\text{l}$  pro ml des Isolation-Cocktails hinzugegeben, mit einer 1000  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze gemischt und bei Raumtemperatur (RT) 15 Minuten inkubiert.

Die mit Dextran beschichteten, magnetischen *beads* (EasySep™ D2 Magnetic Particle, Stemcell Technologies, Katalognr.: 19650) werden vor Verwendung kurz gevortext, mit einer 20  $\mu\text{l}$  Pipette gemischt und anschließend zu den mit Antikörpern markierten Zellen hinzugegeben. Dies ermöglicht, dass die mit Antikörpern gelabelten Zellen durch die magnetischen *beads* gebunden werden und anschließend im Magneten (Easy Sep™ Magnet, Stemcell Technologies, Katalognr.:18000) verbleiben, während die nicht gelabelten Zellen – in unserem Fall  $\gamma\delta$ -T-Zellen- ungebunden bleiben und als Überstand aus dem Röhrchen entnommen werden können. (**Abbildung 4**) Die Zellsuspension wird wieder gut vermischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Vor der magnetischen Separation wird jetzt  $\frac{1}{4}$  der Anfangsmenge an Medium hinzugefügt und 2-3 Mal mit einer 1000  $\mu\text{l}$  Pipette gemischt. Das FACS Röhrchen wird nun in den Magneten gestellt und dort für 7 Minuten belassen. (**Abbildung 4**) Mithilfe einer 1000  $\mu\text{l}$  Pipette wird nun der Überstand aus dem sich noch im Magneten befindenden FACS Röhrchen genommen und in ein neues FACS Röhrchen überführt. Anschließend werden erneut die magnetischen *beads* hinzugegeben, alles erneut gemischt und für 7 Minuten inkubiert. Es erfolgt eine weitere Separation im Magneten. Wie bereits nach der ersten magnetischen Separation wird auch hier wieder der

Überstand mit einer 1000 µl Pipette herausgenommen und in ein neues Röhrchen überführt.



**Abbildung 4: Magnetische Separation mit EasySep Magneten**

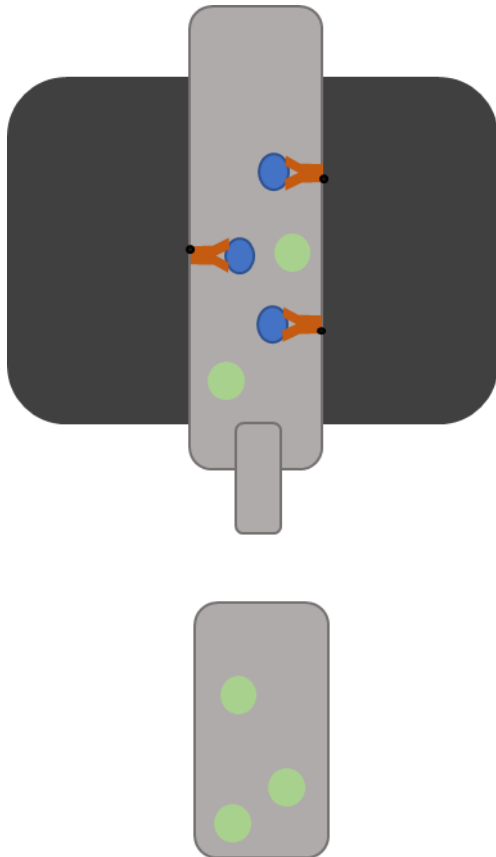
Die mit Antikörper (hier: orange) markierten Zellen legen sich an die Wand des Röhrchens an (hier: blaue Zellen), während die nicht mit Antikörper markierten Zellen (hier: grüne Zellen) in der Mitte des Röhrchens verbleiben. Die Antikörper sind mit magnetischen Partikeln (hier: schwarz) versehen. Die nicht markierten Zellen (hier: grün) werden aus dem FACS-Röhrchen pipettiert, während die mit AK- und magnetischen beads markierten Zellen im Röhrchen verbleiben.

### **2.3.2 TCR $\gamma\delta$ -Isolation-Kit, human [Miltenyi Biotec]**

Auch bei der Isolation mithilfe des *TCR  $\gamma\delta$ -Isolation-Kit, human* von *Miltenyi Biotec* wird ein Antikörper-Cocktail verwendet. Dieser enthält in der kommerziell erhältlichen Variante jedoch keinen Anti-CD16-Antikörper. Die Isolation erfolgt nach dem handelsüblichen Protokoll des *TCR  $\gamma\delta$ -T-Zell-Isolation-Kit*. Im Folgenden wird immer wieder der Begriff *MACS* verwendet. Diese Abkürzung steht für *magnetic activated cell sorting*.

Als Grundlage für die negative Isolation der  $\gamma\delta$  T-Zellen werden frisch isolierte PBMCs verwendet, die wie in Abschnitt 2.2. isoliert werden. Die PBMCs werden mithilfe von Trypanblau gezählt, zentrifugiert [300 xg, 10 Min., 8 °C] und anschließend in 80  $\mu$ l MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Zur Zellsuspension werden 20  $\mu$ l Biotin-Antikörper-Cocktail pro  $10^7$  Zellen gegeben. Das Gemisch wird für 15 Minuten bei 4-8 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation werden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer (Auto MACS rinsing solution, enthält: PBS, 2mM EDTA, 0,5 % FBS, Miltenyi Biotec, Katalognr.: 130-091-222) zentrifugiert [300 xg, 10 Min., 8 °C], die ungebundenen Antikörper herausgewaschen, der Überstand aspiriert und das Zellpellet in 80  $\mu$ l Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen, bevor anschließend 20  $\mu$ l Anti-Biotin-*microbeads* hinzugegeben werden. Diese *microbeads* sorgen dafür, dass die mit Antikörper markierten Zellen durch Bindung des Antikörpers an die magnetischen Partikel an der Magnetsäule anhaften. Die Suspension wird gemischt und ebenfalls für 15 Minuten bei 4-8 °C im Kühlschrank inkubiert. Ungebundene magnetische Partikel werden mit 2 ml Puffer und Zentrifugation [300 xg, 10 Min, 8 °C] herausgewaschen. Die Zellen werden in 500  $\mu$ l Puffer aufgenommen und anschließend magnetisch separiert.

Die magnetische Separation erfolgt je nach Zellzahl mithilfe einer MS (MS Säule, Miltenyi Biotec, Katalognr.: 130-042-201) oder LS Säule (LS Säule, Miltenyi Biotec Katalognr.: 130-041-401) von *Miltenyi Biotec*. Diese wird zuerst mit 500  $\mu$ l bzw. 3 ml Puffer equilibriert. Daraufhin wird die Zellsuspension darauf gegeben. Um alle unmarkierten Zellen herauszuwaschen wird die LS Säule dreimal mit 3 ml Puffer und die MS Säule dreimal mit 500  $\mu$ l Puffer gespült. (**Abbildung 5**)



**Abbildung 5: Magnetische Separation mit  $\gamma\delta$ -T-cell-Isolation-Kit, human von Miltenyi Biotec**

Die mit Antikörper (hier: orange) markierten Zellen legen sich an die Wand des Röhrchens an (hier: blaue Zellen), während die nicht mit Antikörper markierten Zellen (hier: grüne Zellen) in der Mitte des Röhrchens verbleiben. Die Antikörper sind mit magnetischen Partikeln (hier: schwarz) versehen. Diese nicht markierten Zellen (hier: grün) werden durch Spülen der Säule mit Puffer gewonnen, während die magnetisch-markierten Zellen (hier: blau) fixiert durch den Magneten am Rand des Röhrchens verbleiben.

#### 2.4 V $\delta$ 1-Depletion nach negativer T-Zell-Isolation

Da sich im peripheren Blut nicht nur V $\delta$ 2-positive  $\gamma\delta$  T-Zellen befinden, sondern auch ein kleinerer Anteil an V $\delta$ 1-positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen zu finden ist, müssen diese nach der oben beschriebenen negativen Isolation noch depletiert werden. Diese Depletion erfolgte mithilfe einer magnetischen LD Säule (LD Säule, Miltenyi Biotec, Katalognr.: 130-042-901). Die magnetische Separation von V $\delta$ 1-positiven und V $\delta$ 1-negativen Zellen wird nach dem üblichen Protokoll des *Miltenyi Biotec Isolation-Kit* durchgeführt.

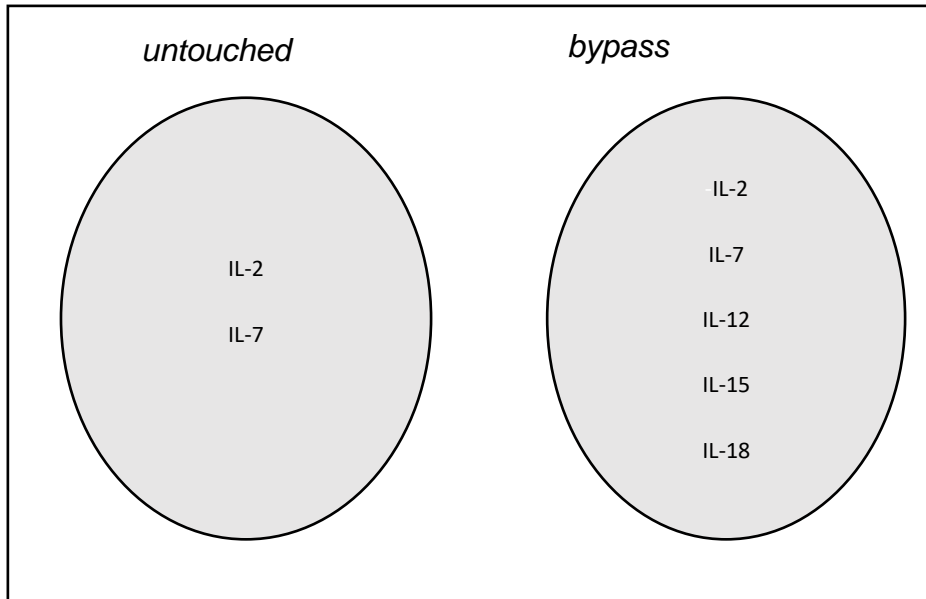
Die in 2.3. isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen werden zunächst in 100  $\mu$ l MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen und mit 1  $\mu$ l Anti-V $\delta$ 1-PE-Antikörper pro  $2 \cdot 10^6$  Zellen

vermischt. Diese Zellsuspension wird dann für 15 Minuten bei 2-8 °C inkubiert. Mithilfe von 2 ml MACS Puffer werden im Anschluss an die Inkubation zentrifugiert [300 xg, 10 Min, 8 °C]. Der Überstand wird aspiriert und das Zellpellet in 80 µl MACS Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. Nun werden die magnetischen Anti-Phycoerythrin-(PE)-microbeads (Anti-PE MicroBeads, Miltenyi Biotec, Katalognr.: 130-048-801) hinzugegeben, die an die mit Fluorochrom (hier: PE) markierten Antikörper gelabelten Zellen binden. Hierzu fügt man 20 µl Anti-PE-microbeads pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzu. Die Suspension wird gut gemischt und wieder für 15 Minuten im Kühlschrank bei 2-8 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Partikel werden anschließend durch 2 ml MACS Puffer herausgewaschen, indem erneut zentrifugiert wird [300xg, 10 Min, 8 °C]. Der Überstand wird aspiriert und das Zellpellet in 500 µl pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert.

Anschließend folgt die magnetische Separation von Vδ1-positiven und Vδ1-negativen Zellen mithilfe einer LD Säule. Diese wird im Magneten platziert und mit 2 ml MACS Puffer durchgespült. Nach der Spülung werden die 500 µl Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die Zellen, die dabei in einem darunter aufgestellten Gefäß tröpfchenweise gesammelt werden, sind die nicht mit Antikörper markierten Zellen. Die magnetischen mit Antikörper markierten Zellen befinden sich noch in der Säule und werden für eine FACS-Analyse mit 2 ml MACS Puffer aus der Säule gespült.

## 2.5 Stimulation mit IL-12,-15,-18 nach negativer T-Zell-Isolation

Ein Teil der negativ isolierten γδ T-Zellen wird in einer 96-well- round bottom plate mit einer Konzentration von 4\*10<sup>5</sup> Zellen/200 µl nur mit den Zytokinen IL-2 [30 U/ml] (rh IL-2, Immuno Tools, Katalognr.: 11340025), IL-7 [1ng/ml] (rh IL-7, Immuno Tools, Katalognr.: 11340073) oder zusätzlich mit IL-12 (Immuno Tools, Katalognr.: 11349123), IL-18 (IL-18, rH, BioLegend, Katalognr.: 592104) und IL-15 (rh IL-15, Immuno Tools, Katalognr.: 11340153) [jeweils 50ng/ml] für 20 Stunden über Nacht inkubiert. (**Abbildung 6**) Die Inkubation über Nacht mit low dose IL-2 und low dose IL-7, welche der Equilibrierung dient, wird im Folgenden auch mit „untouched“ bezeichnet, während die Stimulation mit IL-2, IL-7, IL-12, -15 und -18 auch als „TCR-bypass“ bzw. „bypass“ bezeichnet wird.



**Abbildung 6: Stimulation negativ-isolierter  $\gamma\delta$  T-Zellen mit Zytokinen für 20 Stunden über Nacht**

In einem *well* werden über Nacht  $\gamma\delta$  T-Zellen nur mit den Zytokinen *low dose* IL-2 und *low dose* IL-7 inkubiert (links), während in einem anderen *well* über Nacht  $\gamma\delta$  T-Zellen zusätzlich mit den Zytokinen IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert werden (rechts).

Am nächsten Tag werden die Zellen entnommen, die Zytokine herausgewaschen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen, das keine Zytokine enthält und in *96-well flat bottom plate wells* mit *anti-CD3/CD28-microbeads* (aCD3/28) stimulierten PBMCs (s. 2.6) in einer definierten *effector* zu *target Ratio* (E:T) zusammengesetzt.

## 2.6 PBMC Stimulation mit anti-CD3/CD28-Microbeads

Zwei Tage bevor mit der MLC begonnen wird, müssen die in den PBMCs enthaltenen und für die MLC verwendeten T-Zellen mit aCD3/28 (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 für T Cell Expansion and Activation, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: 11131D) aktiviert werden. Hierfür werden PBMCs aus ca. 10 ml peripherem Blut wie in Punkt 2.2. isoliert, und danach mit einer Konzentration von  $7,5 \cdot 10^5$  Zellen/200  $\mu$ l in einer *96-well-plate flat bottom* für 48 h inkubiert. Zu den 800  $\mu$ l Medium (200 $\mu$ l á 4 *wells*) werden 100 U IL-2/ml hinzugefügt.

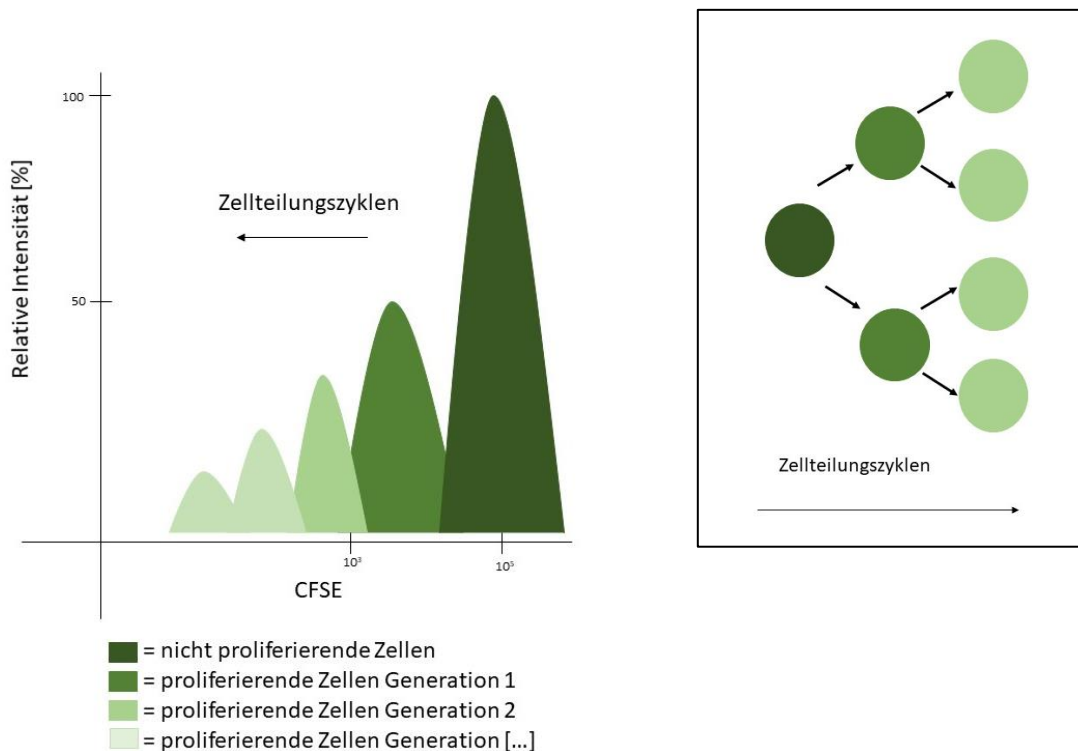
Es werden 22,5  $\mu$ l *dynabeads* in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit 1 ml *dynabeads* Puffer [ $\text{Ca}^{2+}$  u.  $\text{Mg}^{2+}$  free PBS, 0,1% FBS, EDTA 2 mM] gemischt und für eine

Minute in einen Magneten (DynaMPCE-E, Dynal, Katalognr.: 120.04) gestellt. Der Überstand wird mit einer 1000 µl Pipette abgenommen. Anschließend werden die verbliebenen *beads* in RPMI resuspendiert.

Um eine Aktivierung von  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor durch aCD3/CD28 *microbeads* bei der anschließenden Ko-Inkubation auszuschließen, werden *beads* vor Beginn der MLC aus dem Medium depletiert durch Inkubation in einem Magneten (DynaMPCE-E, Dynal, Katalognr.: 120.04). PBMCs bzw. die in den PBMCs enthaltenen T-Zellen werden 48 h mit *beads* stimuliert. Das Medium, in dem sie dazu inkubiert waren, (im Folgenden Abschnitt als „*conditioned medium*“ bezeichnet) wird auch bei der MLC verwendet. Dazu werden die Zellen mit Medium aus dem *well* entnommen und zentrifugiert. Der Überstand „*conditioned medium*“ wird abgenommen, die Zellen in 1 ml RPMI resuspendiert und dann wieder für eine Minute in den Magneten gestellt. Die magnetischen *dynabeads* werden von den zellulären Bestandteilen getrennt und der Überstand kann erneut mit einer 1000 µl Pipette abgenommen und für die MLC weiterverwendet werden.

## 2.7 CFSE-Proliferations-Assay

Die Hälfte der PBMCs werden mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) markiert, um die Proliferation nachzuweisen. Die andere Hälfte der PBMCs wird nicht mit CFSE markiert, da diese für den Apoptose-Assay (siehe unter 2.9) verwendet werden. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der Zellmembranen passieren kann. CFSE bindet an intrazelluläre Moleküle und kann hierdurch Zellen markieren. CFSE eignet sich, um die Proliferation von Lymphozyten zu verfolgen, da sich seine Konzentration durch Zellteilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. (**Abbildung 7**) Es kann somit ein Marker für die Proliferationsaktivität der Zellen sein. Für die Markierung der Zellen mit CFSE wurde das „*Cell Trace Violet Cell Proliferation Kit*“ (CellTrace™ CFSE Proliferation Kit, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: C34557) verwendet.



**Abbildung 7: CFSE-Proliferations-Assay Grundlagen-Schema**

## 2.8 Mixed lymphocyte culture (MLC)

Die Zellen für den Apoptose-Assay (siehe unter 2.9) und den CFSE-Proliferations-Assay werden in einer *96-well-plate* mit flachem Boden inkubiert. Die Konzentration für die PBMCs beträgt  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml. In jedes *well* werden 100  $\mu$ l PBMCs hinzugefügt. In die Hälfte der *wells* werden zu den 100  $\mu$ l PBMCs noch 100  $\mu$ l der frisch-isolierten, nicht-stimulierten („*untouched*“) bzw. der *bypass*-stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen hinzugegeben, ebenfalls mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml. Diese *wells* sind auf **Abbildung 8** mit der Bezeichnung I:I versehen. In den *wells* mit der Bezeichnung 0:I werden zu den 100  $\mu$ l PBMCs noch 100  $\mu$ l RPMI hinzugefügt. Außerdem wird noch IL-2 (rh IL-2, Immuno Tools, Katalognr.: 11340025) mit einer Konzentration von 50 U/ml hinzugegeben. Das Schema für die MLC ist in **Abbildung 8** zu sehen.

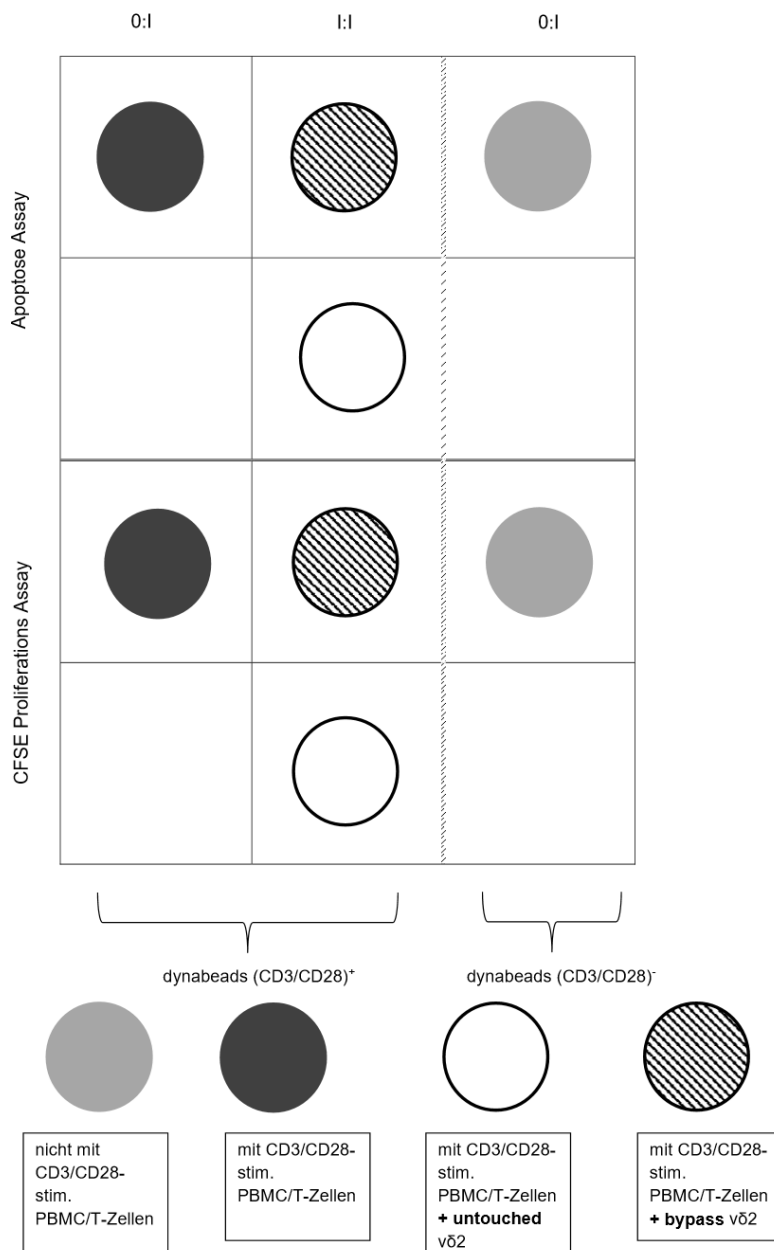


Abbildung 8: MLC-Schema 96-well-plate

## 2.9 FACS-Analysen

Als Analysemethode und zur Auswertung der Zellpopulationen wurde die Durchflusszytometrie gewählt und hier das FACS Canto II Zytometer (BD FACS Canto II flow cytometer, BD Bioscience, Katalognr.: 338962) verwendet.

Um die FACS Analysen durchführen zu können, werden die Zellen mit einer Pipette aus dem *well* entnommen und in ein FACS Röhrchen überführt. Zu den Zellen in den FACS Röhrchen wird 2 ml FACS Puffer [Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup> freies PBS, 2% FBS h.i., 1mM EDTA] hinzugegeben und bei 660 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Die Röhrchen werden anschließend dekantiert und die Antikörper werden in entsprechender Menge (**Tabelle 2**) hinzugegeben. Nach Zugabe der Antikörper wird die Suspension gevortext und im Anschluss für 15 Minuten in Dunkelheit bei RT inkubiert.

**Tabelle 2: FACS-Analyse- Schemata**

<b>FACS-Analyse</b>	<b>Antikörper-Schema</b>	<b>Menge [µl]</b>
<i>Reinheits-FACS</i>	live/dead CD3-PerCP µl Vδ1-PE TCR αβ-APC TCR γδ- FITC	1 1 0,5 1 2
<i>Frequenz-FACS</i>	live/dead CD3 PerCP Vδ2- PE TCR αβ-APC	1 1 1 1
<i>Apoptose-Assay</i> (zusätzliche Informationen s.u.)	“Nr.1:” CD3 APC-Cy7 TCR αβ-APC Vδ2- PE	1 2 0,5
<i>CFSE Proliferations-Assay</i>	CD3 APC-Cy7 7AAD TCR γδ- FITC TCR αβ-APC	1 1 2 2
<i>PD-L1/PD-1-Assay</i>	CD3 APC-Cy7 7AAD TCR γδ- FITC PD1-APC PD-L1 PE-Cy7	1 1 2 1 1

Nach Inkubation werden die Röhrcchen mit 2 ml FACS Puffer aufgefüllt und anschließend wieder bei 660 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Danach werden 100 µl FACS Puffer hinzugegeben und die Analyse durchgeführt.

### 2.10 Apoptose-Assay

Der Apoptose-Assay wird mittels FACS-Färbung bestimmt, dazu werden die Zellen nach der ersten Inkubation mit dem Antikörper-Cocktail „Nr.1“ (**Tabelle 2**) zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend 100 µl des Annexin V Puffers (Annexin V binding buffer [10x], BD Pharmingen Biosciences, Katalognr.: 51-66121E) 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt, in jedes Röhrcchen hinzugegeben.

Um die Negativkontrolle (= Fluorescence minus one = FMO) herzustellen, die später den Cut-off der Analyse bestimmt, wird eine Probe mit regulärem Antikörper-Cocktail Nr.1 (**Tabelle 2**) und zusätzlich lediglich 1 µl 7-Aminoactinomycin (7AAD) versehen, jedoch nicht mit Annexin V FITC. Annexin V ist ein Protein, das verwendet wird, weil es an Phosphatidylserin (PS) binden kann. Gesunde Zellen tragen PS in der inneren Schicht ihrer Zellmembran, während apoptotische Zellen PS im äußeren Layer ihrer Zellmembran tragen. Dadurch wird es für Annexin V möglich, an das PS zu binden. Alle Zellen, die Annexin V<sup>+</sup> sind und dementsprechend PS auf ihrer Oberfläche exprimieren werden in der Auswertung als apoptotische Zellen gewertet. (siehe **Abbildung 9**) 7 AAD hingegen bindet an die DNA nekrotischer Zellen, indem es über die zerstörte Zellmembran der Zellen aufgenommen wird und markiert so nekrotische Zellen. In der FMO ist nur 7AAD enthalten und es können keine Annexin V<sup>+</sup>-Zellen enthalten sein, da nicht mit Annexin V gefärbt wurde. So lässt sich der Cut-off-Wert dort festlegen, wo in der FMO keine Annexin V<sup>+</sup>-Zellen mehr detektiert werden können und man übernimmt dieses FACS-Raster für die folgenden Apoptose-Assay FACS-Auswertungen. (**Abbildung 10**)

In alle anderen Röhrcchen wird nun noch 1 µl Annexin V FITC zur Detektion der apoptotischen Zellen gegeben.

Die Röhrcchen werden für 15 Minuten bei RT inkubiert, anschließend 400 µl Annexin V Puffer hinzugegeben und die FACS-Analyse durchgeführt.

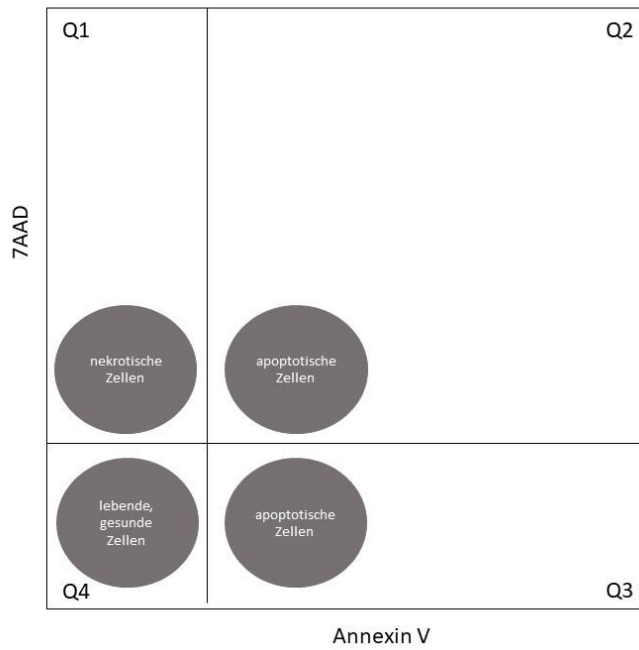


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Analyse des Apoptose Assay mithilfe des FACS

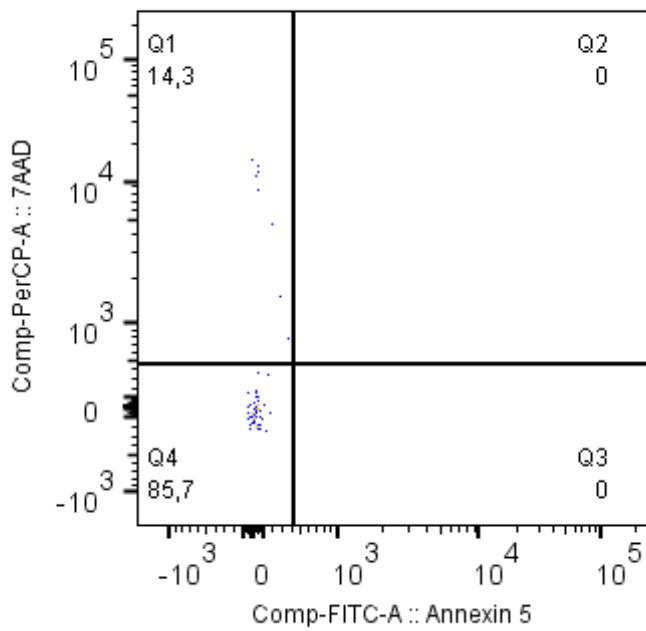


Abbildung 10: Cut-off-Wert Bestimmung für Apoptose Assay

## 2.11 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Katalognr.:714104) verwendet. In Lysepuffer eingeforene Zellpellets lysierte Zellen werden aufgetaut. Das Lysat wird auf eine *QiaShredder*-Säule gegeben und bei 13.000 rpm für 2 Minuten in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Eluat wird mit 350 µl 70%-igem Ethanol vermischt und dann auf eine neue *RNeasy Mini spin* Säule überführt. Es wird erneut, diesmal für 15 Sekunden, bei 10.000 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, 700 µl RWE1-Puffer dazugegeben und für eine Minute bei 10.000 rpm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen. Auf die Säule werden 500 µl RPE-Puffer gegeben. Es wird für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Erneut wird der Durchfluss verworfen, 700 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die *RNeasy Mini spin* Säule wird in ein neues 2 ml Sammelröhrchen überführt, welches in der Zentrifuge für 1 Minute bei 13.000 rpm (Höchstgeschwindigkeit) zentrifugiert wird, um die Membran in der *Mini spin* Säule zu trocknen. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml „Eppendorf Cup“ mit Deckel überführt. Es werden 30-50 µl Ribonuklease-freies Wasser auf die Membran pipettiert und die Säule für eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

Reinheit und Konzentration der RNA wird mithilfe des *Nanodrop™ 2000/2000c Spektralphotometer* bestimmt.

## 2.12 cDNA-Synthese

Die neu gewonnene RNA kann direkt zur Synthese von complementary Desoxyribonukleinsäure (cDNA) weiterverwendet werden. Zur DNA-Synthese wurde das SuperScript™ III First Strand Synthesis System (SuperScript™ III First Strand Synthesis System, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: 18080-051) Es werden circa 3 µl der RNA mit 0,5 µl 50 µM *oligo(dT) Primern* und 0,5 µl *annealing buffer* zusammen pipettiert, durch *tapping* gemischt und dann herunterzentrifugiert. Die Proben werden in einem Thermozykler bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss werden sie für eine Minute auf Eis gelagert. Zu

jeder Probe werden 5 µl 2X *First-Strand-Reaction-Mix* und 1 µl *SuperScript RNaseOUT Enzyme Mix* gegeben und erneut kurz vermischt. Im Thermozykler werden diese nun zuerst für 50 Minuten bei 50°C und dann bei 85°C für 5 Minuten inkubiert. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) sollte dann einige Minuten auf Eis gelagert werden, um anschließend bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt zu werden.

### 2.13 Quantitative PCR (qPCR: realtime PCR)

Für die qPCR werden die in **Tabelle 4** aufgelisteten *Primer* für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), PD-L1 und PD1 benötigt. cDNA, Primer reverse und forward, der GoTaqMastermix und steriles Wasser werden zusammengemischt. Die genaue Zusammensetzung und die Mengenangaben des qPCR-Reaktionsgemisch ist in **Tabelle 3** beschrieben.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemisch für die qPCR-Analyse**

cDNA	2 ng in 1 µl
GoTaq Mastermix	5 µl
Primer forward <sup>1</sup> (100nM)	0,2 µl (2 pmol)
Primer reverse <sup>2</sup> (100nM)	0,2 µl (2 pmol)
H <sub>2</sub> O	3,6 µl
<b>Gesamtmenge</b>	<b>10 µl</b>

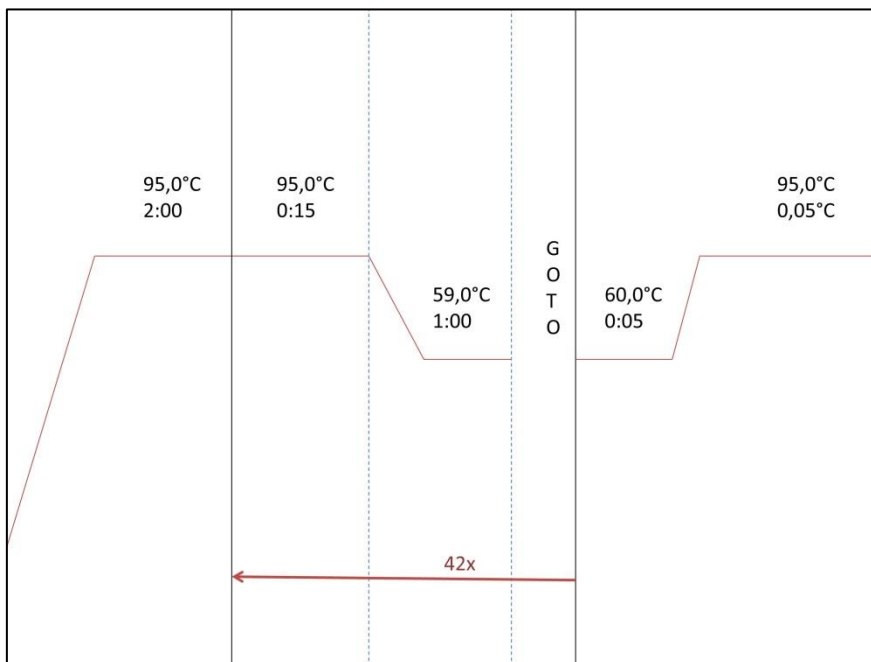
**Tabelle 4: Primer-Sequenzen für qPCR**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
<i>GAPDH (forward)</i>	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'
<i>GAPDH (reverse)</i>	5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGACT-3'
<i>PD-L1 (forward)</i>	5'AAATGGAACCTGGCGAAAGC-3'
<i>PD-L1 (reverse)</i>	5'GATGAGCCCCTCAGGCATTT-3'
<i>PD1 (forward)</i>	5'-ATCAAAGAGAGCCTGCGGG-3'
<i>PD1 (reverse)</i>	5'-GGTGGGCTGTGGGACT-3'

<sup>1</sup> Sequenz der Primer in Tabelle 4

<sup>2</sup> Sequenz der Primer in Tabelle 4

Die qPCR cycle Programme sind in **Abbildung 11** zu sehen.



**Abbildung 11: Ablaufschema qPCR**

## 2.14 Statistische Methoden

Die statistischen Tests wurden mithilfe von *GraphPad PRISM 8* durchgeführt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem unpaired *student's t tests* mit Welch-Korrektur für normalverteilte Daten durchgeführt. Eine Normalverteilung der Daten wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Statistische Signifikanz wurde durch  $*p < 0,05$  definiert.

Für die Bestimmung der Korrelation wurde der Pearson-Test für parametrisch verteilte Daten verwendet. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung einer Regressionsgeraden. Statistische Signifikanz wurde auch hier mit  $*p < 0,05$  definiert.

## 2.15 Ethik-Votum

Die vorliegende Arbeit wurde unter dem Ethik-Votum 105/2017BO2 durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gewinnung von untouched $V\gamma 9\delta 2$ T-Zellen aus PBMCs

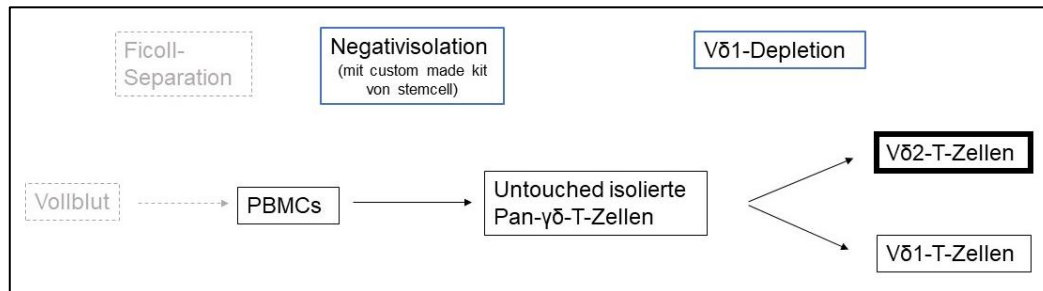


Abbildung 12: Ablauf der Isolation von untouched isolierten  $V\delta 2$ -T-Zellen

##### 3.1.1 Bestimmung der $V\gamma 9\delta 2$ -Frequenz in PBMCs vor Isolation

Die Frequenz von  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen wurde vor der Isolation aus peripherem Blut bestimmt. Probanden wurden ausgewählt, wenn sie eine Frequenz der Zielpopulation von über 4 Prozent im peripheren Blut aufwiesen, um bei der anschließenden MACS basierten Isolation eine ausreichende Anzahl von  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen zu erhalten. Die Frequenz wurde in den PBMCs der Spender nach Färbung (siehe MM-Teil) mithilfe des BD FACS Canto II Flow Zytometer bestimmt und anschließend mit FlowJo ausgewertet. Die FACS-*blots* sind in **Abbildung 13** zu sehen.

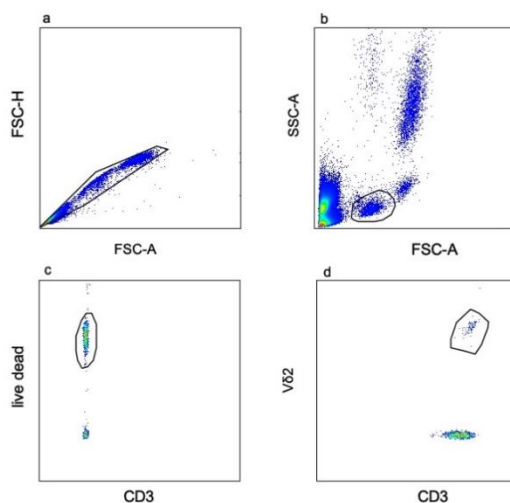


Abbildung 13:  $V\gamma 9\delta 2$ -Frequenzanalyse in isolierten PBMCs veranschaulicht an einem repräsentativen Probanden

Gegated wurde auf singlets [a], Lymphozyten [b], live dead/CD3<sup>+</sup>-Zellen [c] und  $V\delta 2^+$ -Zellen [d]

Die Spender [n=7] zeigten nach Ficoll-Isolation der PBMCs eine V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zell-Frequenz zwischen 7,57 % und 18 % in der Population der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. **Abbildung 14** zeigt die Frequenzen der V $\delta$ 2 $\gamma$ 9 T-Zellfraktion nach Isolation der PBMC mit Ficoll von 7 Probanden, bestimmt mit der FACS-Analyse.

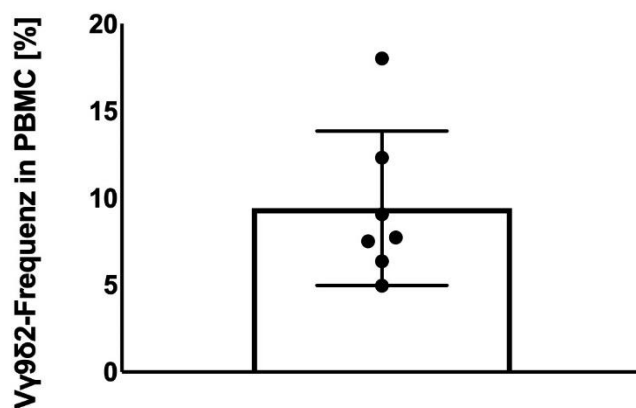


Abbildung 14: Anteil der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen an PBMCs bei den 7 Probanden [%]

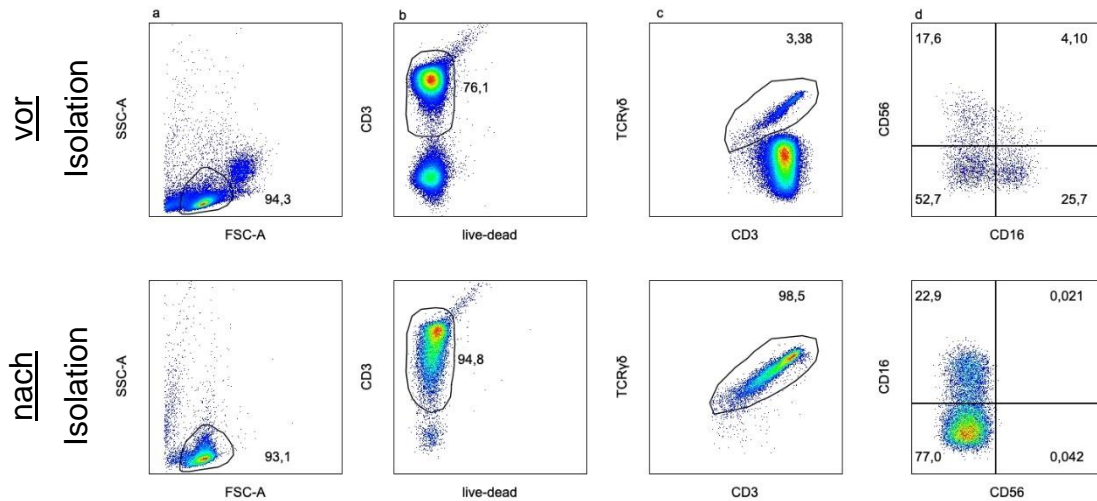
### 3.1.2 Vergleich des CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>-</sup> Isolation Cocktails

Zuerst wurden die V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mit dem kommerziell erhältlichen *Easy sep human  $\gamma\delta$  T cell Isolation kit* von *stemcell* isoliert. Dieses kit sortiert durch die Zusammensetzung seines Isolationcocktails alle nicht- $\gamma\delta$  T-Zellen durch magnetisches Markieren aus (negative Isolation) und ermöglicht so eine Reinheit bis zu 97%.

Allerdings zeigte eine FACS-Analyse nach Isolation, dass etwa 29,8 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen innerhalb der PBMCs vor der negativen Isolation einen CD16-Rezeptor auf ihrer Oberfläche trugen. In der FACS-Analyse nach Isolation konnten diese Zellen nicht mehr detektiert werden. Sie wurden also durch das magnetische *cell-sorting* aussortiert. (**Abbildung 15**)

Um in folgenden Isolationen CD16<sup>+</sup>- $\gamma\delta$  T-Zellen nicht durch Isolation zu verlieren, wurde im Weiteren ein *custom made kit* von *stemcell* verwendet, der keinen anti-CD16-AK (aCD16) im Depletionscocktail enthielt. Vergleichend wurden  $\gamma\delta$  T-

Zellen von drei Probanden jeweils sowohl mit dem *custom made kit* als auch dem kommerziellen aCD16-beinhaltenen Cocktail isoliert.



**Abbildung 15: FACS-Analyse zur Detektion von CD16<sup>+</sup> γδ T-Zellen vor und nach negativer Isolation**

Gegated wurde auf Lymphozyten [a], live dead/CD3<sup>+</sup>-Zellen [b], γδ-T-Zellen [c], CD16 und CD56 [d].

Oben: Vor Negativ-Isolation konnte mithilfe der FACS-Analyse festgestellt werden, dass 29,8% γδ T-Zellen einen CD-16-Oberflächenmarker trugen.

Unten: Dieselbe Analyse wurde nach der Negativ-Isolation erneut durchgeführt, um festzustellen, dass dann nur noch 0,063% der γδ T-Zellen mit einem CD16-Oberflächenmarker detektiert werden konnten, da sie durch entsprechende Antikörper im Isolations-Kit aussortiert worden waren.

Mit dem aCD16-freien Cocktail wurde erwartungsgemäß eine höhere Ausbeute an γδ T-Zellen erzielt als mit dem aCD16-beinhaltenen Cocktail bei sehr guter Reinheit (Tabelle 5). Die Ausbeute berechnet sich mit folgender Formel:

**Formel 2: Berechnung der Ausbeute an γδ T-Zellen nach Isolation**

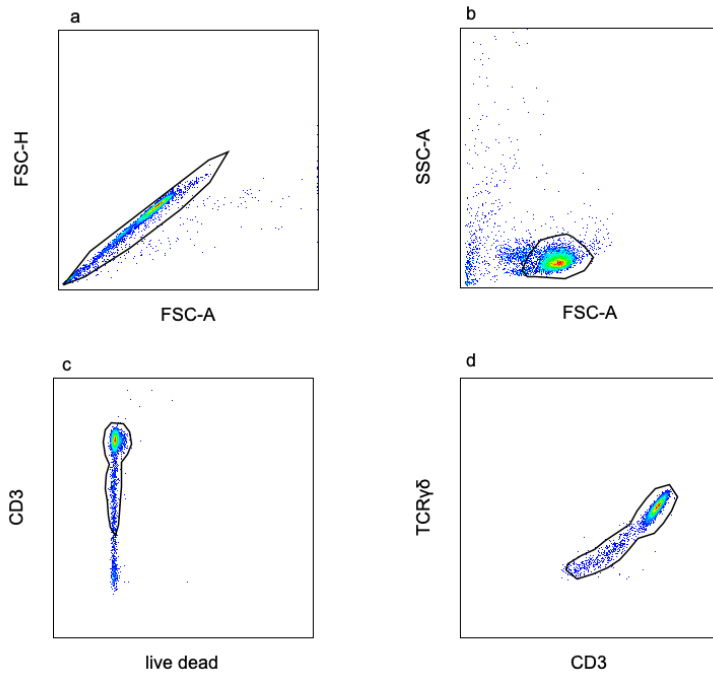
$$\text{Ausbeute an } \gamma\delta\text{-T-Zellen [\%]} = \frac{\text{tatsächliche Anzahl } \gamma\delta\text{-T-Zellen}}{\text{erwartete Anzahl } \gamma\delta\text{-T-Zellen}} * 100$$

Bei allen Spendern [n=3] ergab der custom made cocktail, der kein aCD16 enthielt eine höhere Ausbeute bei erhöhter Reinheit als der aCD16<sup>+</sup> Isolationskit, der einen erheblichen Teil der γδ T-Zellen depletierte. Deshalb wurde bei den anschließenden Probanden [n=4] nur noch der anti-CD16-freie Isolationscocktail verwendet.

**Tabelle 5: Vergleich der Reinheit und Frequenz der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Isolation durch aCD16+ oder aCD16- Isolations-Kit**

	Anzahl PBMCs nach Ficoll-Separation		Zellzahl isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen NACH negativer Isolation		Ausbeute an $\gamma\delta$ T-Zellen nach Isolation [%] <i>(siehe Formel 2)</i>		Reinheit isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen nach negativer Isolation [%]	
	aCD16+	aCD16-	aCD16+	aCD16-	aCD16+	aCD16-	aCD16+	aCD16-
Spender 1 [1]	$5,94 \cdot 10^7$	$4,86 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^6$	$2,217 \cdot 10^6$	74,83	91,9	96	99,1
Spender 2 [2]	$8 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^7$	$1,92 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	37	59,67	95,4	98,3
Spender 3 [3]	$4 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^7$	$1,285 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^6$	41,55	97,7	96,3	96,9

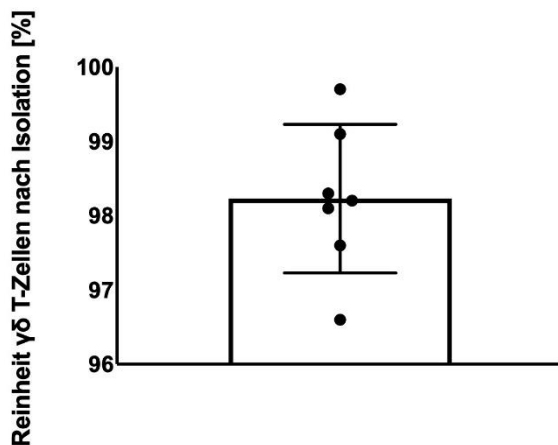
### 3.1.3 Negative Isolation von untouched Pan- $\gamma\delta$ T-Zellen aus PBMC



**Abbildung 16:** Schema für FACS-Analyse zur Reinheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Isolation veranschaulicht an einem repräsentativen Probanden

Gegated wurde auf singlets [a], Lymphozyten [b], live dead/CD3<sup>+</sup>-Zellen [c] und  $\gamma\delta$  T-Zellen [d].

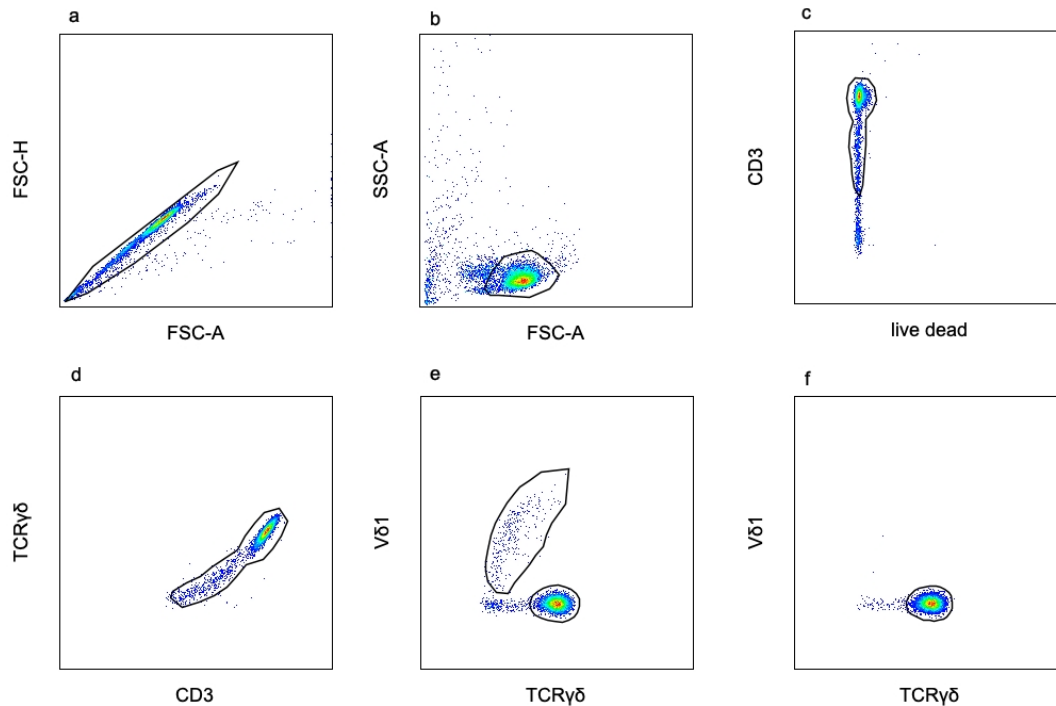
Die Reinheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen betrug zwischen 96,6 % und 99,7 %. Die Prozentzahlen der jeweiligen Zellpopulationen der einzelnen Spender sind in **Abbildung 17** noch einmal dargestellt.



**Abbildung 17:** Reinheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Isolation mit dem CD16-freien-Cocktail [%]

Die Proben aller Spender [n=7] konnten nach der negativen Isolation mit dem CD16-freien Cocktail in der FACS-Analyse eine Reinheit der CD3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen zwischen 96,6 % und 99,7 % aufweisen.

Mittels FACS-Analyse wurde nach Negativisolation der  $\gamma\delta$  T-Zellen bestimmt wie groß die Fraktion  $V\delta 1^+\gamma\delta$  T-Zellen war. Das *Gating* im FlowJo-Programm erfolgte nach dem in **Abbildung 18** dargestellten Schema.



**Abbildung 18: Schema für FACS Analyse zur Differenzierung zwischen  $\gamma\delta$  T-Zellen mit  $V\delta 1$ -Rezeptor und  $V\delta 2$ -Rezeptor nach Isolation veranschaulicht an einem repräsentativen Probanden**

Gegated wurde auf singlets [a], Lymphozyten [b], live dead/CD3<sup>+</sup>-Zellen [c],  $\gamma\delta$  T-Zellen [d] und  $V\delta 1$ -TCR vor Depletion [e] und nach Depletion [f].

Um mit reinen  $V\delta 2$ -Populationen zu arbeiten, wurde der Anteil an  $V\delta 1$  T-Zellen an  $\gamma\delta$  T-Zellen durch magnetisches *cell-sorting* depletiert. **Abbildung 19** zeigt den Anteil der verschiedenen  $\gamma\delta$ -Subpopulationen an der Pan- $\gamma\delta$ -Population. Die Proben aller Spender [n=7] zeigten nach der negativen Isolation mit dem aCD16-freien Cocktail in der FACS-Analyse zwischen 3,14 % und 11,6 %  $V\delta 1$ - $\gamma\delta$  T-Zellen und zwischen 83,3 % und 94,2 %  $V\delta 2$ - $\gamma\delta$  T-Zellen.

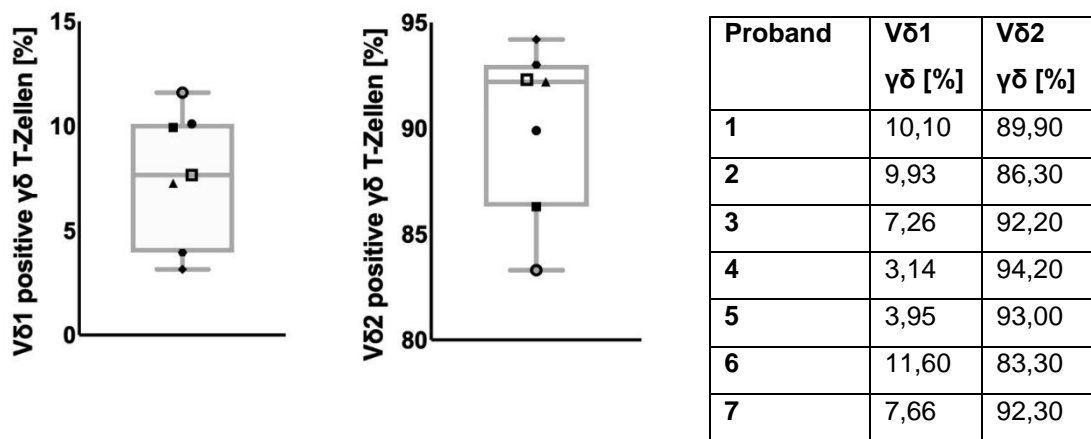


Abbildung 19: Anteil der  $\gamma\delta$ -Subpopulationen an der Gesamtheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Negativ-Isolation [%]

### 3.1.4 Bestimmung der Reinheit von $V\gamma 9\delta 2$ T-Zellen nach $V\delta 1$ -Depletion

Die Reinheit der  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen wurde nach Depletion der  $V\delta 1$ - $\gamma\delta$  T-Zellen erneut mithilfe einer FACS-Analyse bestimmt. Beispielhaft ist die Reinheit der Depletion in **Abbildung 18** gezeigt. Die Prozentzahlen der Proben [n=7] sind in **Abbildung 20** noch einmal dargestellt.

Der Anteil  $V\delta 1$ - $\gamma\delta$  T-Zellen lag nach Depletion zwischen 0% und 0,07%. Die Reinheit  $V\delta 2$ - $\gamma\delta$  T-Zellen betrug nach Depletion zwischen 98,6% und 100%. Ein Einfluss von  $V\delta 1$ - $\gamma\delta$  T-Zellen kann für die folgenden Experimente also ausgeschlossen werden.

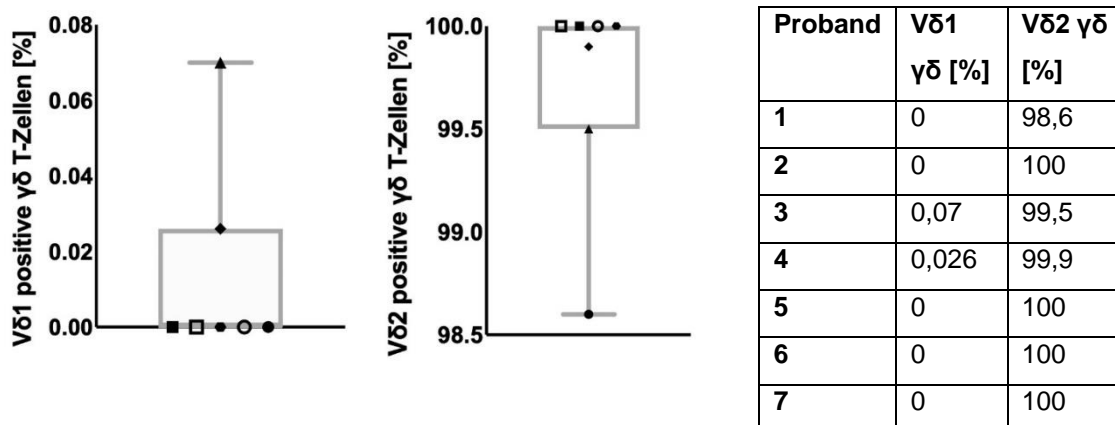
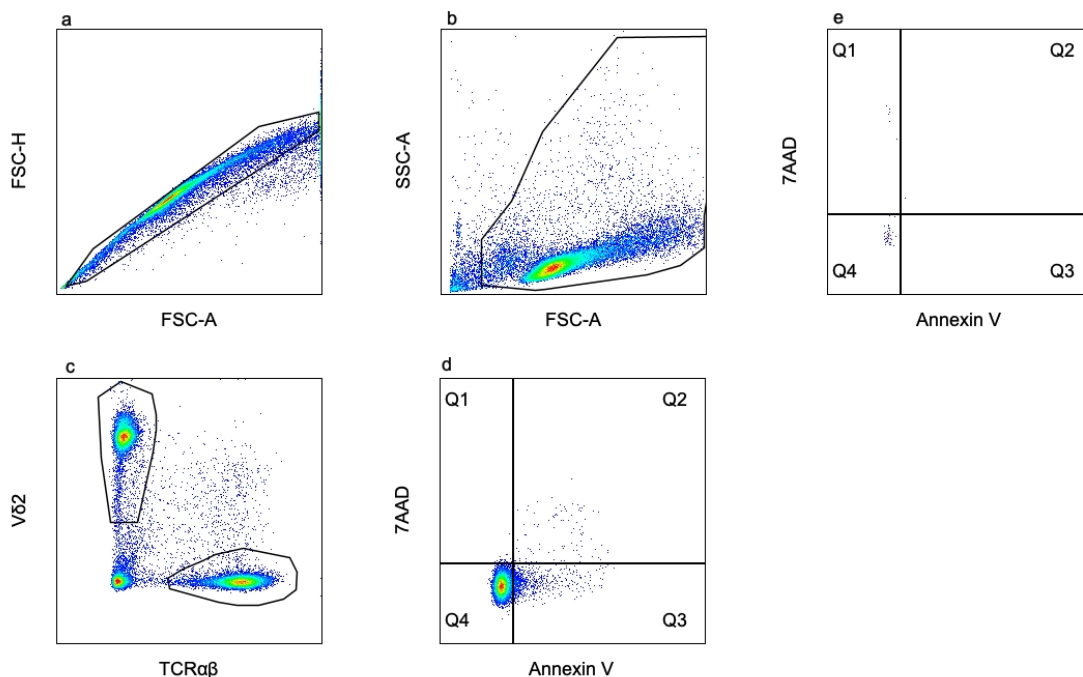


Abbildung 20: Anteil der  $\gamma\delta$ -Subpopulationen an der Gesamtheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach  $V\delta 1$ -Depletion [%]

### 3.2 Apoptoseinduktion in autologen, CD3/CD28-aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen durch untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen bzw. bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen

Um zu beobachten, inwiefern untouched<sup>3</sup> V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen bzw. bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen<sup>4</sup> bei autologen, CD3/CD28-aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen Apoptose induzieren, wurden diese in einer MLC im Verhältnis 1:1 für 20 Stunden inkubiert. Im FACS wurde die Apoptoseinduktion anschließend mithilfe der Marker 7AAD und Annexin V untersucht. Die Funktionsweise der Marker Annexin V und 7AAD ist unter dem Abschnitt 2.10. noch einmal genauer erklärt. Der für die FACS-Analyse verwendete FACS-*blot* ist in **Abbildung 21** gezeigt. Als apoptotische Zellen wurden die Annexin V positiven Zellen gewertet (in Quadranten Q2 = früh-apoptotische Zellen und Q3 = apoptotische Zellen).

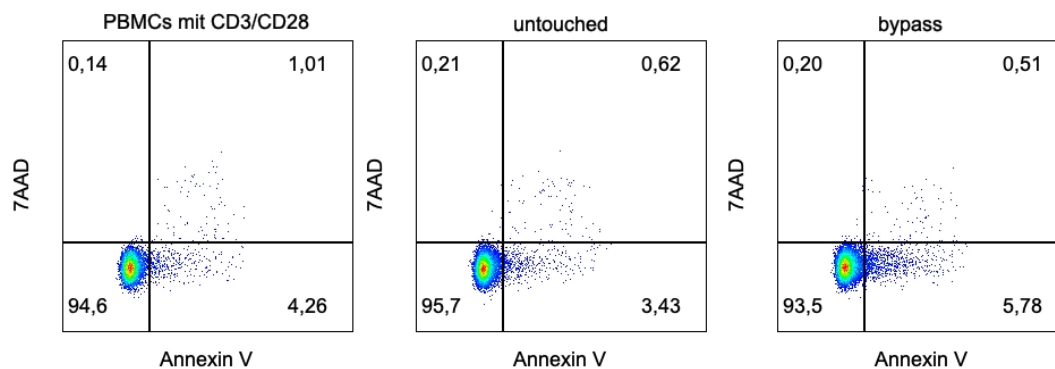


**Abbildung 21: Repräsentative FACS-Analyse der Apoptoseinduktion in  $\alpha\beta$  T-Zellen durch autologe V $\delta$ 2-T-Zellen**

Gegated wurde auf singlets [a], Lymphozyten [b], V $\delta$ 2 und TCR $\alpha\beta$  und dann Annexin V bzw 7AAD positive  $\alpha\beta$  T-Zellen. In [e] ist die FMO dargestellt.

<sup>3</sup> ex vivo, negativ-isolierte V $\delta$ 2 $\gamma$ 9 T-Zellen mit low dose IL-2 und IL-7 stimuliert (siehe MM-Teil), **im Folgenden als „untouched“ bezeichnet**

<sup>4</sup> ex vivo, negativ isolierte V $\delta$ 2 $\gamma$ 9 T-Zellen mit IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 stimuliert (siehe MM-Teil), **im Folgenden als „bypass“ bezeichnet**



**Abbildung 22: Repräsentative Veranschaulichung der Apoptoseinduktion in autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen durch untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen bzw. bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [%]**

Apoptotische Zellen: Annexin V<sup>+</sup> Zellen [oben rechts] (Annexin V<sup>+</sup> und 7AAD<sup>+</sup>= apoptotisch) und [unten rechts] (Annexin V<sup>+</sup> und 7AAD<sup>-</sup> = früh-apoptotisch)

links: Kontrollgruppe (CD3/CD28-stimulierte PBMC ohne Ko-Inkubation mit V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen)

Mitte: CD3/CD28-stimulierte PBMC nach Inkubation mit untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen

rechts: CD3/CD28-stimulierte PBMC nach Inkubation mit bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen

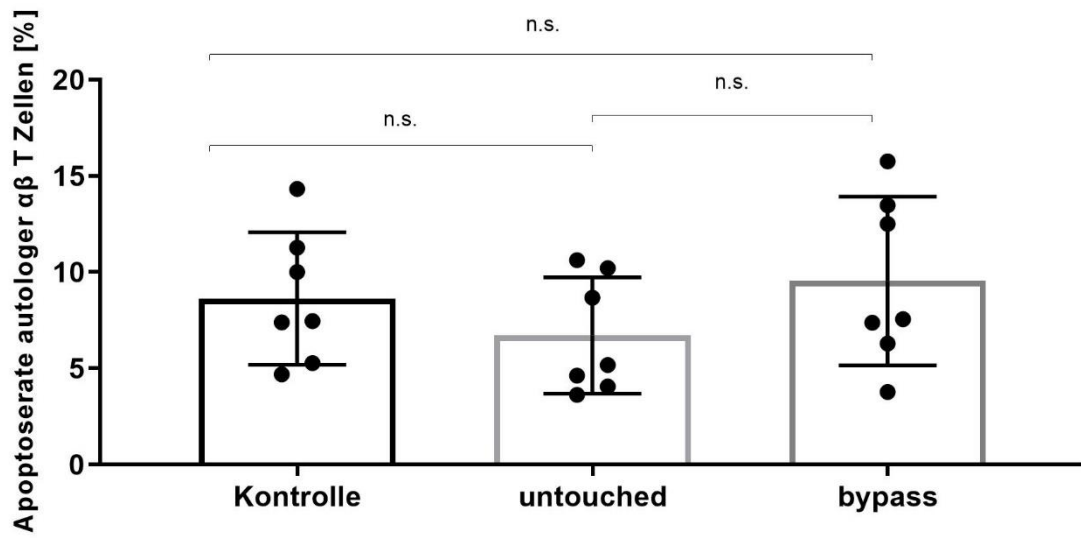
Wurden CD3/CD28-aktivierte  $\alpha\beta$  T-Zellen mit untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen zusammengesetzt [n=7], zeigten die  $\alpha\beta$  T-Zellen in Bezug auf die Kontrollgruppe (nur CD3/CD28-aktivierte PBMCs ohne Inkubation mit V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen) keine erhöhte Apoptoseinduktion, (gemessen anhand der Rate an Annexin V-positiven  $\alpha\beta$  T-Zellen). (Beispielhaft in **Abbildung 22** gezeigt.)

Die Apoptoseinduktion betrug bei der untouched Zellpopulation im Durchschnitt 6,71%. (**Abbildung 23**)

Auch die für 20 h bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [n=7] zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine erhöhte Apoptoseinduktion in autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen. (Beispielhaft in **Abbildung 22** gezeigt.)

Die Rate an Annexin V positiven  $\alpha\beta$  T-Zellen betrug nach Co-Inkubation mit bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen im Durchschnitt 9,54%. (**Abbildung 23**)

Weder die untouched noch die bypass-stimulierten Zellpopulationen konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. im Vergleich untereinander signifikant Apoptose bei CD3/CD28-stimulierten  $\alpha\beta$  T-Zellen induzieren.



V $\delta$ 2-Stimulation vor MLC	IL-2	-	+	+
	IL-7	-	+	+
	IL-12	-	-	+
	IL-15	-	-	+
	IL-18	-	-	+

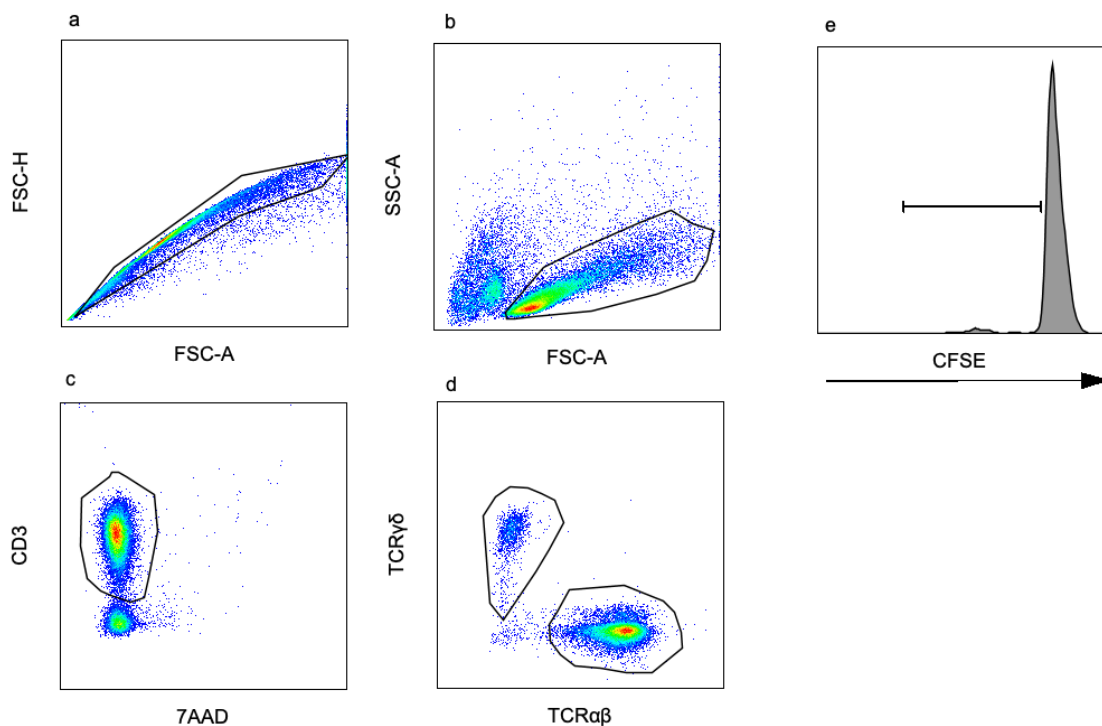
**Abbildung 23: Apoptoseinduktion bei CD3/CD28 aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen [%]**

Die drei Zellpopulationen (Kontrolle, untouched, bypass) zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede, was die Induktion von Apoptose bei CD3/CD28 aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen betrifft. \* $p < 0,05$

### 3.3 Immunsuppressives Potential von untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen und bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen gegenüber autologen, CD3/CD28-aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen

Um das immunsuppressive Potential von untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen beziehungsweise bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen gegenüber autologen CD3/CD28 aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen zu untersuchen, wurden diese in einer MLC im Verhältnis 1:1 für 72 Stunden inkubiert. Im FACS wurde der Proliferations-Assay anschließend mithilfe des Farbstoffes CFSE untersucht. Mit CFSE wurden die mit CD3/CD28 stimulierten T-Zellen gefärbt. Diese Färbung ist unter Abschnitt 2.7 bereits genauer erklärt.

Die FACS-Auswertung erfolgte durch die in **Abbildung 24** gezeigten FACS-*blots*.



**Abbildung 24: Repräsentative FACS-Analyse zum immunsuppressiven Potential von V $\delta$ 2 T-Zellen gegenüber autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen [%]**

Gegated wurde auf singlets [a], Lymphozyten [b], live dead/CD3<sup>+</sup>-Zellen [c] und  $\gamma\delta$  und  $\alpha\beta$  T-Zellen [d]. In [e] zu sehen sind die  $\alpha\beta$  T-Zellen, die zuvor mit CFSE gefärbt wurden. Die in [e] beispielhaft dargestellte Population, sind nicht mit CD3/28 stimulierte  $\alpha\beta$  T-Zellen, die demzufolge nicht proliferiert haben. (CFSE-Proliferations-Assay siehe unter 2.7)

Wie bereits in den Methoden unter Abschnitt 2.7 erklärt, wird der Farbstoff CFSE bei proliferierenden Zellen zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt, somit halbiert sich der CFSE-Gehalt pro T-Zelle, die proliferiert hat. Das heißt, dass T-Zellen, die proliferieren an CFSE-Signalstärke im FACS verlieren, und zwar proportional zur Proliferationsrate. Die in der FACS-Analyse detektierten T-Zellen zeigen, dass die Zellen, die proliferiert haben, weniger CFSE besitzen.

Die Zellpopulationen im CFSE- Proliferations-Assay werden wie folgt beschrieben:

- I. **Negativkontrolle:** αβ T-Zellen (PBMCs), nicht CD3/CD28-stimuliert
- II. **Positivkontrolle:** αβ T-Zellen (PBMCs), CD3/CD28-stimuliert
- III. **Untouched:** αβ T-Zellen (PBMCs), CD3/CD28-stimuliert plus untouched Vγ9δ2 T-Zellen
- IV. **bypass:** αβ T-Zellen (PBMCs), CD3/CD28-stimuliert plus bypass-stimulierte Vγ9δ2 T-Zellen

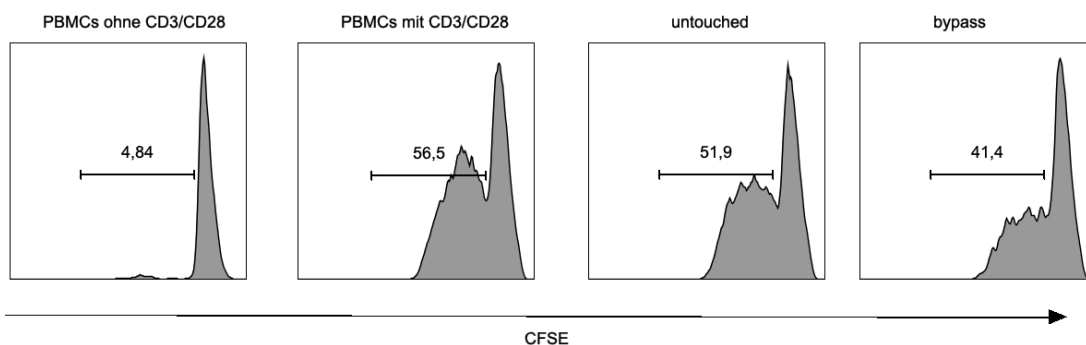
(Die Zellpopulationen sind außerdem unter Abschnitt 2.8 im MLC-Schema beschrieben)

Die Suppression durch Vγ9δ2 T-Zellen wurde mit folgender Formel errechnet:

**Formel 3: Berechnung der Suppression durch Vγ9δ2 T-Zellen:**

$$\text{Suppression der Proliferation [\%]} = \left[ \left( \frac{\text{Positivkontrolle} - \text{Zellpopulation "X"}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \right) * 100 \right]$$

„Zellpopulation X“ bezeichnet die jeweilige untersuchte Gruppe, also z.B. untouched oder bypass.



**Abbildung 25: Darstellung eines Suppressionsassays für die 4 unterschiedlichen Ansätze in der FACS-Analyse zum immunsuppressiven Potential von Vγ9δ2 T-Zellen**

Beispielhafte Berechnung des suppressiven Potentials anhand der Werte aus **Abbildung 25** mithilfe von **Formel 3**:

NK = 4,84 % (der  $\alpha\beta$  T-Zellen haben proliferiert)

PK = 56,5 % (der  $\alpha\beta$  T-Zellen haben proliferiert)

Zellpopulation „X“ = Zellpopulation untouched = 51,9 % (der  $\alpha\beta$  T-Zellen haben proliferiert)

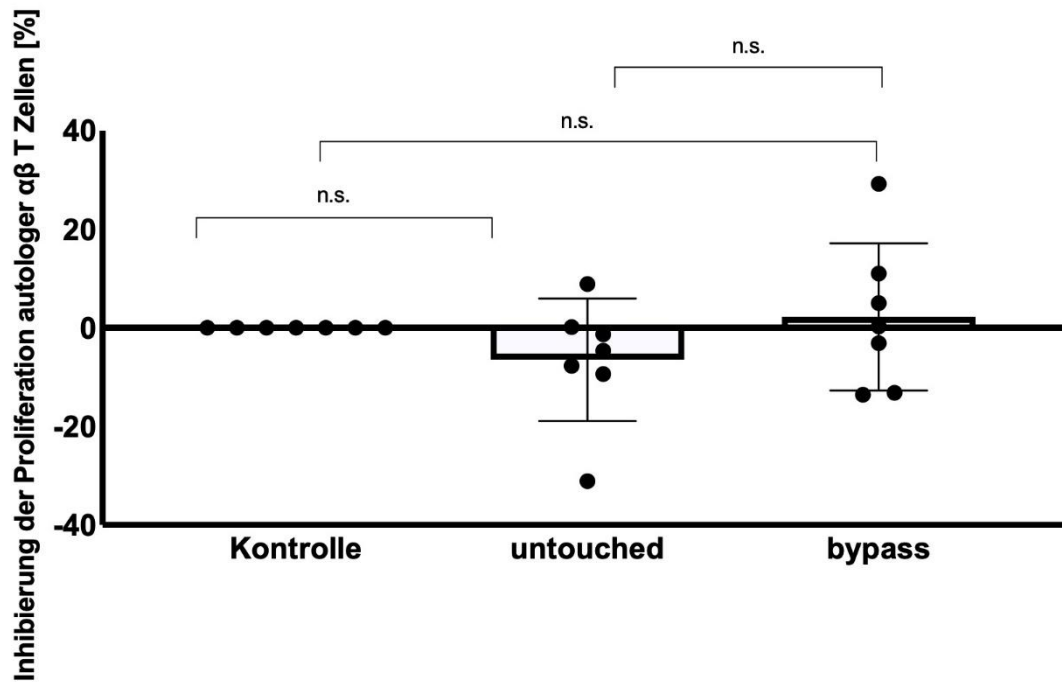
1.	Suppression der Proliferation[%] = $\left[ \left( \frac{56,5\% - 51,9\%}{56,5\% - 4,84\%} \right) * 100 \right]$
2.	Suppression der Proliferation[%] = $\left[ \left( \frac{4,6\%}{51,66\%} \right) * 100 \right]$
3.	Suppression der Proliferation[%] = [0,089] = 8,9%

Anmerkung: Ein positiver Wert als Ergebnis der Berechnung wie in dem obigen Beispiel weist auf eine Suppression der Proliferation der autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation hin.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse nach Berechnung durch **Formel 3** sind in **Abbildung 26** gezeigt. Die drei Versuchsansätze (Kontrolle, untouched und bypass) zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede, was die Inhibierung der Proliferation CD3/CD28-aktivierter, autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen betrifft.

**Abbildung 26** zeigt, dass bei Zugabe von untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen keine Proliferationssuppression bei autologen, aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen hervorgerufen werden konnte. Auch bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen zeigten kein suppressives Verhalten gegenüber autologen, aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen im Vergleich zur Kontroll- und untouched-Gruppe.

Es zeigen also weder untouched noch bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen regulatorische Eigenschaften in Form von Proliferationssuppression bei autologen, aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen.



V $\delta$ 2-Stimulation vor MLC	IL-2	-	+	+
	IL-7	-	+	+
	IL-12	-	-	+
	IL-15	-	-	+
	IL-18	-	-	+

Abbildung 26: Inhibierung der Proliferation aktivierter, autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen durch V $\delta$ 2-T-Zellen [%]

Die drei Zellpopulationen (Kontrolle, untouched, bypass) zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede, was die Inhibierung der Proliferation bei CD3/CD28 aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen betrifft. \*p < 0,05

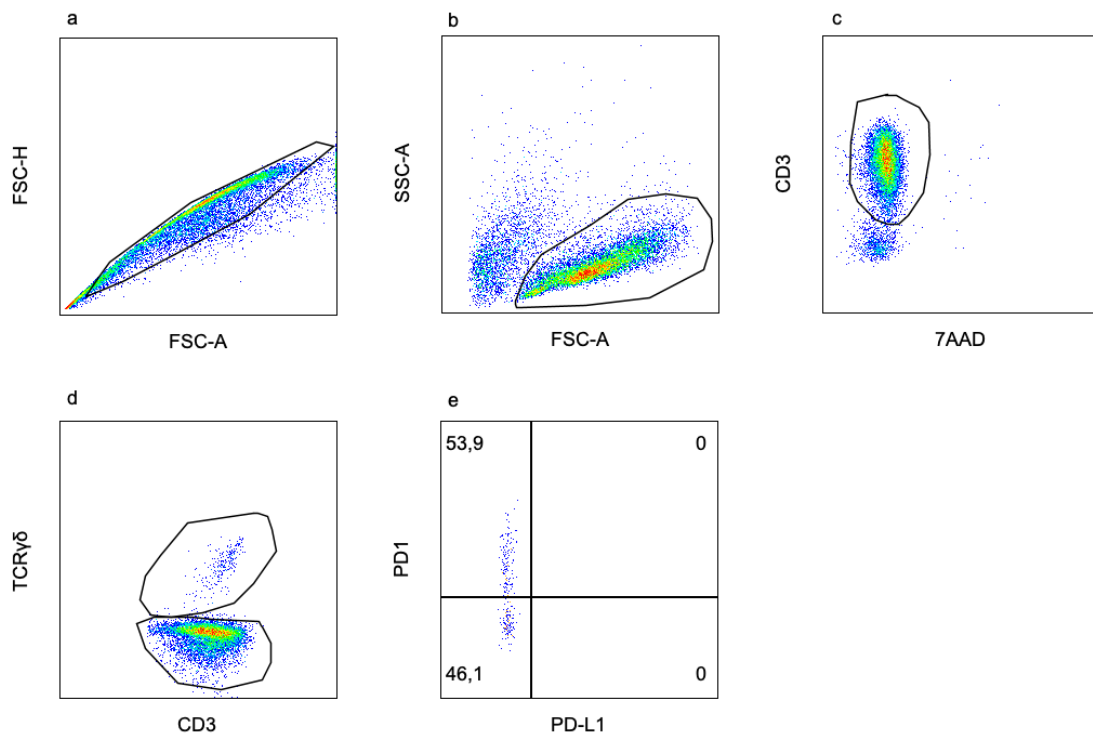
### 3.4 PD-L1 und PD-1 Expression als Marker des zytotoxischen und des Apoptose-induzierenden Potentials von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen

Wie in der Einleitung erklärt, fungiert die PD1/PD-L1-Achse im Kontext des Immunsystems bei der Suppression von T-Zellen, die entweder durch andere T-Zellen, wie  $\gamma\delta$  T-Zellen [84, 101] oder durch Tumorzellen im Rahmen des *immune escape* supprimiert werden [96]. Daher wurde untersucht, ob bei unseren V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 Zellkohorten (untouched und bypass) eine PD-1 bzw. PD-L1-

Expression vorhanden war, um zu verstehen, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser beiden Marker und der negativen Wirkung von  $\gamma\delta$  T-Zellen (Apoptoseinduktion und Inhibierung der Proliferation autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen) hergestellt werden kann.

Um Transkriptom- und Proteom-Ebene vergleichen zu können, wurden neben der Oberflächenexpression im FACS auch die mRNA-Level von PD-1 und PD-L1 in  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen in der qPCR untersucht.

Außerdem wurde die Expression der Marker PD-1 und PD-L1 auf Proteom-Ebene vor und nach der MLC verglichen, um Veränderungen der Expression während der Inkubation mit autologen, CD3/CD28-aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen zu detektieren.



**Abbildung 27: Repräsentative FACS-Analyse zur Expression von PD-L1 und PD-1 auf untouched  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen [%]**

Gegated wurde auf singlets [a], Lymphozyten [b], live dead/CD3<sup>+</sup>-Zellen [c] und  $\gamma\delta$  T-Zellen [d]. In [e] zu sehen ist die Expression von PD-1 und PD-L1 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die in [e] beispielhaft dargestellte Population sind untouched  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen nach MLC.

Die FACS-*blots* zur PD-L1 und PD-1 Expression auf  $V\gamma 9\delta 2$  T-Zellen sind in **Abbildung 27** zu sehen.

### 3.4.1 PD-L1 und PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen vor MLC (Proteom)

Die Expression von PD-L1 und PD-1 auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen wurde, wenn genügend Zellen zur Verfügung standen, vor der MLC mittels FACS-Analyse gemessen. Dies war leider nicht bei allen Spendern möglich, da die Zellzahlen sonst für die MLC nicht ausgereicht hätten.

Untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [n=2] exprimierten vor der MLC zu 7,89% und 36,61% PD-1. Bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [n=2] hingegen zeigten vor Beginn der Zellkultur eine PD-1 Expression von 23,09 % und 47,5 %. (**Abbildung 28**)

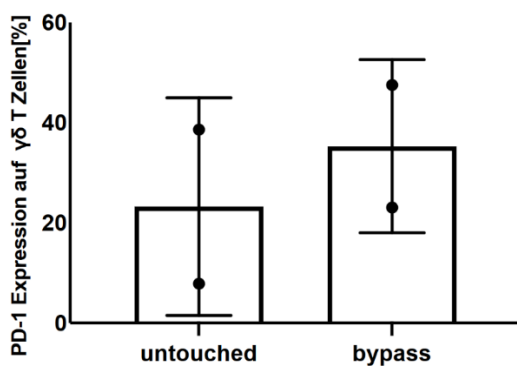


Abbildung 28: PD-1 Expression auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=2] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC [%]

Untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [n=3] zeigten vor der MLC praktisch keine PD-L1 Expression. PD-L1 exprimierten sie nur in sehr geringen Mengen (zwischen 0,026 % und 0,78 % der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen Zellen). 50% der bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [n=2] hingegen zeigten eine PD-L1 Expression (47,5 % und 51,9 %) (**Abbildung 29**).

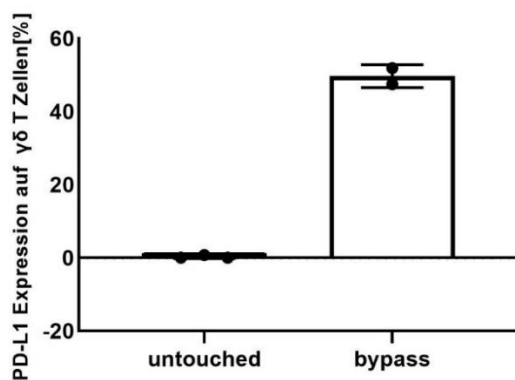


Abbildung 29: PD-L1 Expression auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=3] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC [%]

### **3.4.2 PD-L1 und PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in qPCR vor MLC (Transkriptom)**

Um einen Vergleich zwischen der Transkriptom- und Proteom-Ebene zu haben, wurde neben der Oberflächenexpression im FACS auch korrespondierend die mRNA-Level von PD-1 und PD-L1 in V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in der qPCR untersucht. Untersucht wurde dies für die Kohorten untouched bzw. bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen. Ob diese Werte potenziell prädiktiv für das Potential Apoptose zu induzieren sind bzw. für immunsuppressives Potential gegenüber autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen angesehen werden können, ist kontextabhängig. Bei simultaner Expression von PD-1 und PD-L1 auf der gleichen (T-)Zellentität beeinflussen verschiedene Faktoren, in welcher Form eine Interaktion der beiden Rezeptoren stattfindet. Je nachdem sind die beiden Rezeptoren in cis (PD-1 und PD-L1 werden auf derselben (T-)Zellentität exprimiert) oder trans (PD-1 und PD-L1 werden auf unterschiedlichen (T-)Zellentitäten exprimiert) wirksam [102]. Aktiviert zum Beispiel PD-1 auf APC oder Tumorzellen das Cis-exprimierte PD-L1 kommt es zu einer neutralisierenden (u.a. anti-tumorösen) Wirkung, da die die T-Zellen unterdrückende Interaktion zwischen PD-1 und Trans-PD-L1 entfällt, während eine Interaktion zwischen PD-1 auf APC oder Tumorzellen mit trans-exprimiertem PD-L1 auf verschiedenen T-Zellenentitäten eine inhibierende Wirkung auf die T-Zellfunktion hat [102].

Die untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2-Zellpopulation [n=4] zeigte nach Isolation leicht höhere mRNA-Level sowohl für PD-1 als auch für PD-L1 im Vergleich zur bypass-Zellpopulation [n=2]. Die Ergebnisse hierzu sind in **Abbildung 30** und **Abbildung 31** gezeigt.

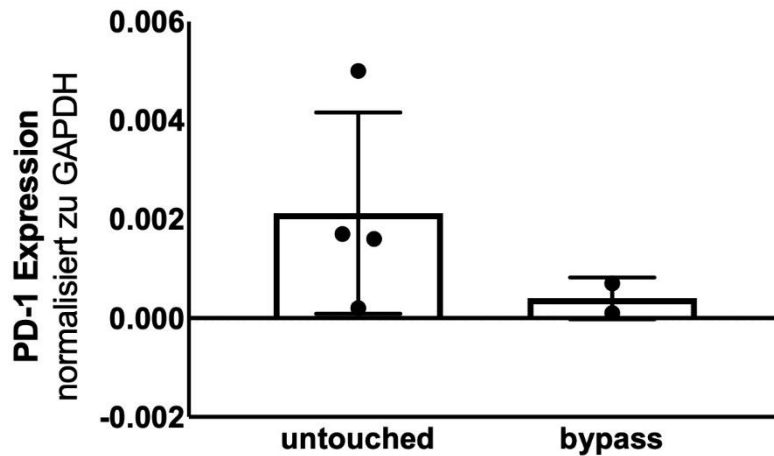


Abbildung 30: PD-1 mRNA-Level auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=4] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC

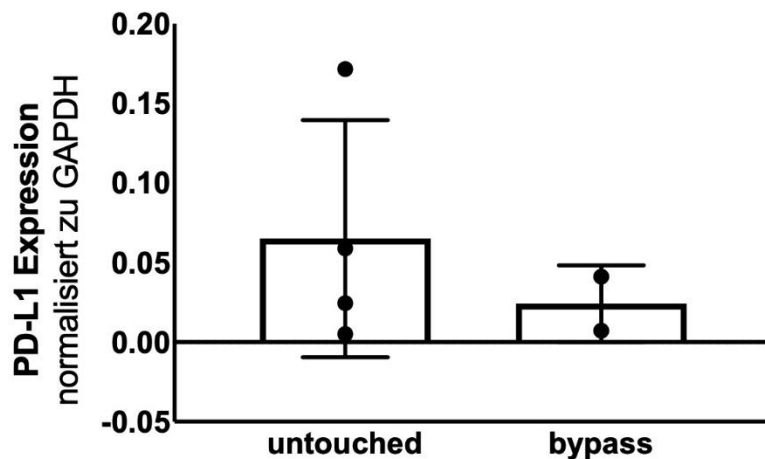


Abbildung 31: PD-L1 mRNA-Level auf untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [links] [n=4] bzw. bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen [rechts] [n=2] vor MLC

### 3.4.3 Vergleich von PD-1 und PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in qPCR (Transkriptom) und FACS (Proteom) vor MLC

Untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen enthielten leicht höhere mRNA-Level für PD-L1 bzw. PD-1 als bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen (**Abbildung 31**). Es ist also eine Tendenz zu sehen, dass die Befunde der PD-L1 und PD-1 Expression im FACS umgekehrt mit den Befunden in der qPCR korrelieren (**Abbildung 29**). Anders bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen. Diese zeigten in der qPCR niedrigere PD-L1 bzw. PD-1 mRNA-Level als untersuchte untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen (**Abbildung 30**), jedoch im FACS eine erhöhte PD-L1 bzw. PD-1 Expression. (**Abbildung 29**)

Das bedeutet, die Transkription für PD-L1 bzw. PD-1 scheint umgekehrt proportional mit der Oberflächenexpression des Moleküls zu korrelieren.

#### **3.4.4 PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC**

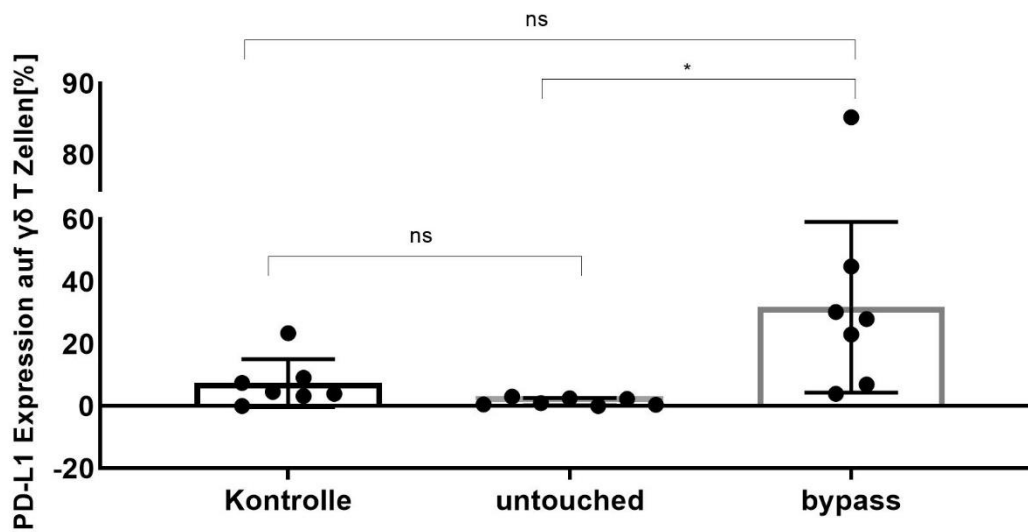
Die PD-L1 Expression von untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen und bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen wurde nach 72 h Inkubation mit autologen, CD3/CD28-aktivierten T-Zellen in einer FACS-Analyse gemessen. Als Kontroll-Zellpopulation [n=7] dienten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen in autologen, CD3/CD28-aktivierten PBMCs, die für 72h in RPMI inkubiert wurden (*Kontrolle*).

Die V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen der Kontroll-Zellpopulation zeigte eine PD-L1 Expression zwischen 0 % und 23,39 %.

Die PD-L1 Expression der untouched-Zellpopulation [n=7] lag zwischen 0,037 % und 3,04 %. Die bypass-Zellpopulation [n=7] zeigte eine PD-L1 Expression mit großer Streubreite mit Werten zwischen 3,97 % und 85,25 %.

Nach der MLC zeigten untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen somit eine geringere bzw. unveränderte PD-L1 Expression im Vergleich zur Kontroll-Zellpopulation. Die bypass-stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen hingegen zeigten im Vergleich zur Kontroll-Zellpopulation eine erhöhte PD-L1 Expression auf ihrer Oberfläche.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede der PD-L1 Expression zwischen der untouched- und bypass-Zellpopulation. (**Abbildung 32**)



V $\delta$ 2-Stimulation vor MLC	IL-2	-	+	+
	IL-7	-	+	+
	IL-12	-	-	+
	IL-15	-	-	+
	IL-18	-	-	+

Abbildung 32: PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC [%]

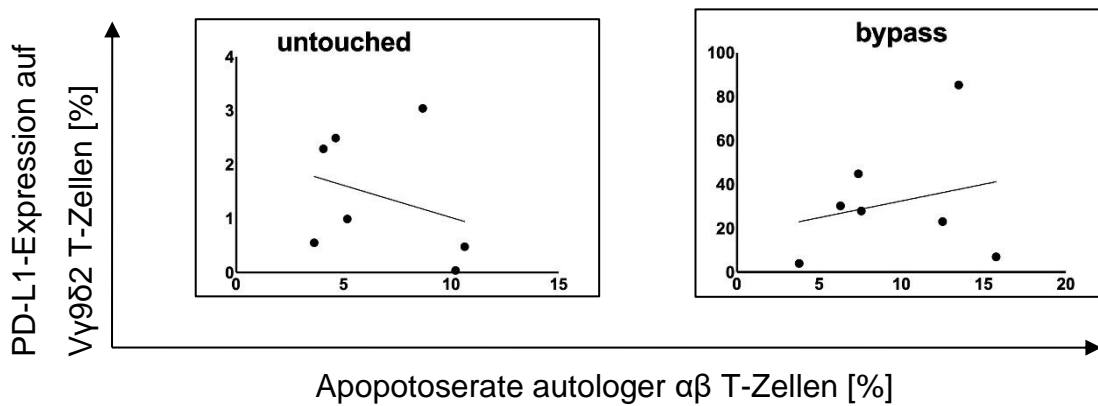
Signifikante Unterschiede der PD-L1 Expression zeigten sich zwischen der *untouched*- und *bypass*-Zellpopulation. \*p < 0,05

Wenn man diese Werte mit **Abbildung 29** vergleicht, zeigen sich keine Veränderungen in der PD-L1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach Inkubation mit aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen im Vergleich zu den Werten vor der MLC.

### 3.4.5 Korrelation zwischen PD-L1-Expression (Proteom) und Apoptose-Induktion

Nach Messung der PD-L1-Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mithilfe des FACS wurde mithilfe des Pearson-Test bestimmt, ob eine Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers und dem Potential der Zellen Apoptose bei autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen zu induzieren besteht. (**Abbildung 33**) Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers PD-L1 und der Apoptoserate autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen bestimmt werden.

Das bedeutet, dass eine hohe Expression des Markers PD-L1 nicht mit einer hohen Apoptoserate von autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen einhergeht und umgekehrt.

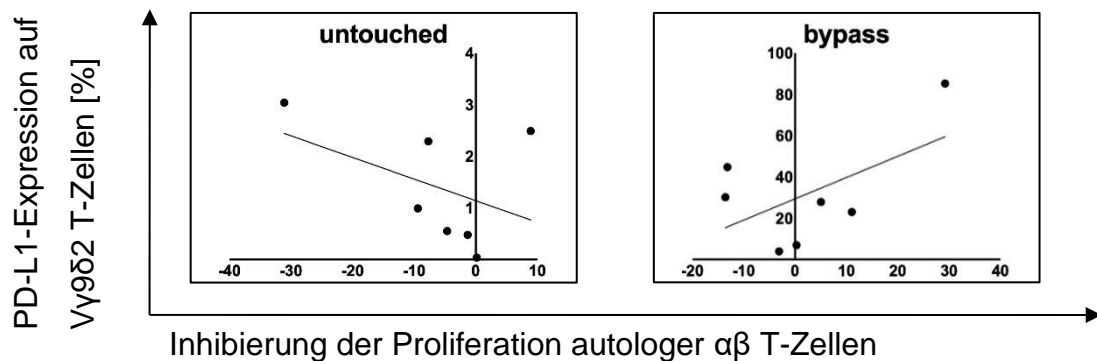


**Abbildung 33** Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in MLC induzierten Apoptoserate von aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte Vγ9Vδ2 T-Zellen.

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in der MLC induzierten Apoptoserate bei aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen \*p < 0,05

### 3.4.6 Korrelation zwischen PD-L1-Expression (Proteom) und immunsuppressivem Potential

Nach Messung der PD-L1-Expression auf Vγ9δ2 T-Zellen mithilfe des FACS wurde außerdem mit dem Pearson-Test bestimmt, ob eine Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers und der Inhibierung der Proliferation autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen besteht. (**Abbildung 34**) Es konnte auch hier keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers PD-L1 und der Inhibierung der Proliferation autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen aufgezeigt werden.

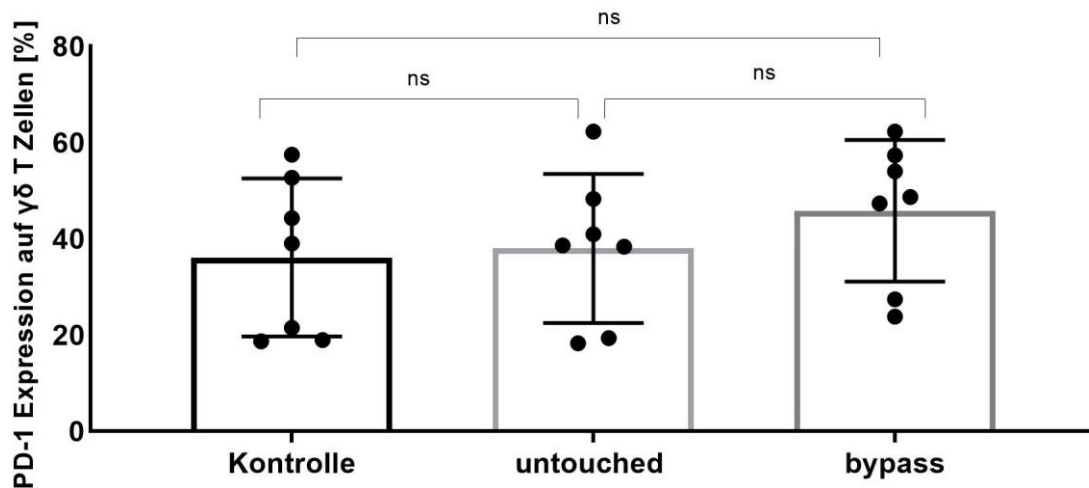


**Abbildung 34:** Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in MLC induzierten Inhibierung der Proliferation von autologen αβ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte Vy9δ2 T-Zellen.

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der in der MLC induzierten Inhibierung der Proliferation von aktivierten, autologen αβ T-Zellen \*p < 0,05

### 3.4.7 PD-1 Expression auf Vy9δ2 T-Zellen nach MLC

Die PD-1 Expression wurde bei untouched Vy9δ2 T-Zellen und mit bypass-stimulierten Vy9δ2 T-Zellen nach 72 h Inkubation mit autologen PBMCs in einer FACS-Analyse gemessen. Die Werte wurden mit der Kontroll-Zellpopulation verglichen (*Kontrolle*). Die Kontroll-Zellpopulation [n=7] waren Vy9δ2 T-Zellen in autologen, CD3/CD28-aktivierten T-Zellen, die für 72h in RPMI waren. Die untouched Zellpopulation [n=7] zeigte eine PD-1 Expression zwischen 18,28 % und 62,3 %, während die bypass-Zellpopulation [n=7] eine PD-1 Expression zwischen 23,8 % und 62,27 % aufwies. Die Kontroll-Zellpopulation zeigte eine PD-1 Expression zwischen 18,69 % und 57,53 %. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Expression von PD-1 nach 72 h Inkubation. (**Abbildung 35**)



V $\delta$ 2-Stimulation vor MLC	IL-2	-	+	+
	IL-7	-	+	+
	IL-12	-	-	+
	IL-15	-	-	+
	IL-18	-	-	+

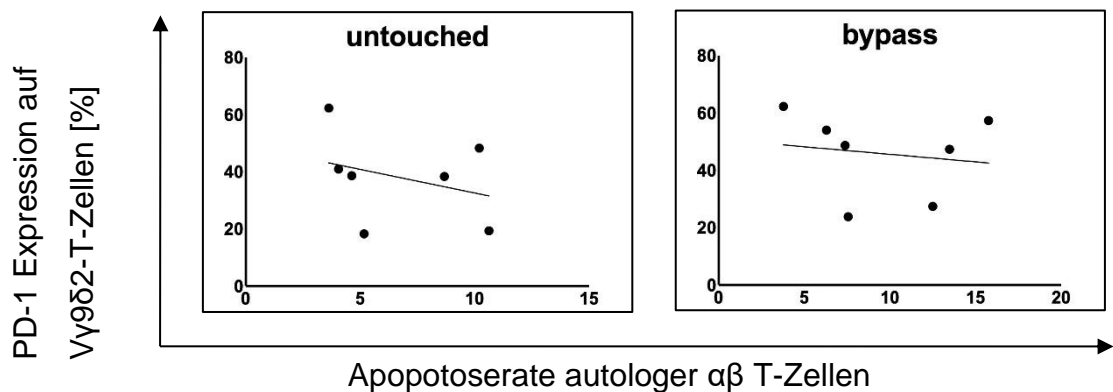
Abbildung 35: PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach MLC

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der PD-1 Expression zwischen den Zellpopulationen *untouched*, *bypass* oder Kontrolle. \*p < 0,05

Wenn man diese Werte mit **Abbildung 28** vergleicht, zeigen sich keine Veränderungen in der PD-1 Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen nach Inkubation mit aktivierten, autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen im Vergleich zu den Werten vor der MLC.

### 3.4.8 Korrelation zwischen PD-1-Expression (Proteom) und Apoptose-Induktion

Nach Messung der PD-1-Expression auf V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mithilfe des FACS wurde mit dem Pearson-Test bestimmt, ob eine Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers und dem Potential der Zellen Apoptose bei autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen zu induzieren besteht. (**Abbildung 36**) Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers PD-1 und der Apoptoserate autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen bestimmt werden.

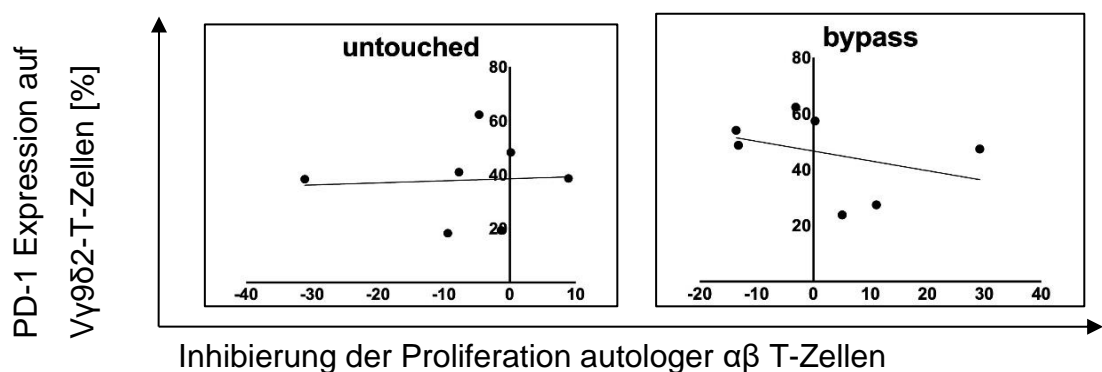


**Abbildung 36:** Korrelation zwischen der PD-1-Expression und der in MLC induzierten Apoptoserate von autologen αβ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte Vγ9δ2 T-Zellen.

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der PD-1-Expression und der in der MLC induzierten Apoptoserate bei aktivierten, autologen αβ T-Zellen \*p < 0,05

### 3.4.9 Korrelation zwischen PD-1-Expression (Proteom) und immunsuppressivem Potential

Nach Messung der PD-1-Expression auf Vγ9δ2 T-Zellen mithilfe des FACS wurde außerdem bestimmt, ob eine Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers und der Inhibierung der Proliferation autologer αβ T-Zellen besteht. (**Abbildung 37**) Es konnte auch hier keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmarkers PD-1 und der Inhibierung der Proliferation autologer αβ T-Zellen aufgezeigt werden.



**Abbildung 37:** Korrelation zwischen der PD-1-Expression und der in MLC induzierten Inhibierung der Proliferation von autologen αβ T-Zellen durch untouched oder bypass-stimulierte Vγ9δ2 T-Zellen.

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der PD-1-Expression und der in der MLC induzierten Inhibierung der Proliferation von aktivierten, autologen αβ T-Zellen \*p < 0,05

## 4 Diskussion

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, wird die Therapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen immer häufiger in Studien zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen angewendet [1-13]. Zum einen erfolgt die Anwendung in klinischen, in-vivo Studien [2, 5, 7, 11-13], zum anderen in in-vitro Studien [3, 7, 10, 41, 84, 103]. Bei den in vitro bzw. in vivo untersuchten Tumorentitäten handelt es sich unter anderem um das Nierenzellkarzinom [2, 5, 11], aber auch um AML [11], (metastasiertes) Melanom [11, 41, 84], Neuroblastom [3], Mammakarzinom [41], Prostatakarzinom [41] und auch Glioblastom [84].

$\gamma\delta$  T-Zellen spielen eine grundlegende Rolle bei der Tumorabwehr des Körpers. Dies zeigte sich unter anderem in Experimenten, bei denen  $\gamma\delta$ -depletierte Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für die Entstehung von Tumoren zeigten [104].  $\gamma\delta$  T-Zellen weisen verschiedene Eigenschaften auf, durch die sie sich zur Tumortherapie zum Beispiel in Form des adoptiven Zelltransfers eignen. Zu diesen vorteilhaften Eigenschaften zählen folgende:

- 1) Sie können mit ihren Oberflächenrezeptoren Tumorzellen erkennen. Es hat sich gezeigt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen zum einen durch ihren T-Zell-Rezeptor, aber auch durch Expression von Natural-Killer-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche maligne Zellen erkennen und anschließend abtöten können [103, 105]. Diese Rezeptoren erkennen, die von den Tumoren exprimierten, Oberflächenmarker wie ULBP und MICA/MICB. Wrobel et. al vermuten ein Zusammenspiel der beiden Rezeptoren bei der Abtötung verschiedener, solider Tumorentitäten durch  $\gamma\delta$  T-Zellen [103].
- 2) Die oben genannten klinischen Studien zeigen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen zytolytisches Potential gegenüber Tumorzellen nach Stimulation mit Phosphoantigenen aufweisen [3, 7, 84]. Eine effiziente Zytolyse der Tumorzellen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen kann auch sehr gut durch kombinierte Stimulation mit verschiedenen Phosphoantigenen erfolgen (z.B. IPP und BrHPP) [103]. Wie Miyashita et al. in einem vergleichenden Review mehrerer klinischer Studien zeigten, wurde bei der Immuntherapie mit  $\gamma\delta$

T-Zellen meist die Kombination aus Bisphosphonat (Zoledronat oder Pamidronat) und IL-2 verwendet [106].

- 3)  $\gamma\delta$  T-Zellen sind in der Lage zur Antigen-Kreuzpräsentation. Das bedeutet, dass sie über ihre MHC-Moleküle anderen Immunzellen zum Beispiel Tumorantigene oder virale/bakterielle Antigene präsentieren können und so diese Immunzellen stimulieren und eine effektivere Immunreaktion hervorrufen können [41].
- 4) Gentles et al. analysierten in ihrer Studie die Daten von 18.000 Patienten, um zu überprüfen, welche Immunzellen in der Tumormikroumgebung (Tumormicroenvironment, TME) einen prognostisch günstigen bzw. prognostisch ungünstigen Einfluss hatten. Es zeigte sich hier ein prognostisch günstiger Einfluss auf das Tumorwachstum durch im TME vorhandene  $\gamma\delta$  T-Zellen [107].
- 5) Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erkennen  $\gamma\delta$  T-Zellen im Gegensatz zur größeren Gruppe der  $\alpha\beta$  T-Zellen Antigene MHC-unabhängig, was zusätzlich zu einer schnell möglichen Aktivierung der Zellen außerdem das Risiko einer sogenannten Graft-versus-host-Krankheit vermindert [89].

In der Tumorthherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigt sich trotz dieser Faktoren kein wirklicher Benefit im Sinne eines verbesserten Überlebens bzw. der Induktion von CR, PR oder SD [6]. Keine Studie konnte bisher ein besseres outcome bei den behandelten Patienten zeigen.

Bevor wir den in dieser Arbeit untersuchten Aspekt der Immunsuppression durch  $\gamma\delta$  T-Zellen als möglichen Faktor besprechen, der ein Ansprechen auf die adoptive Zelltherapie mit  $\gamma\delta$  T Zellen verhindert, werden in den folgenden Abschnitten zunächst andere, die Therapie eventuell einschränkende Faktoren, beleuchtet.

Vergleicht man die oben genannten Tumorthherapie-Studien mit  $\gamma\delta$  T-Zellen miteinander, so gestaltet sich dies recht schwierig, da die Stimulationsformen der  $\gamma\delta$  T-Zellen in diesen Studien stark variieren. So verwendeten einige Gruppen in ihren Studien in vivo eine Kombination aus ZOL und IL-2 [12, 13] wohingegen

andere Gruppen BrHPP in Kombination mit IL-2 verwendeten [5], Während Kobayashi et al. in ihrer Studie  $\gamma\delta$  T-Zellen mit IL-2 und 2-methyl-3-butenylpyrophosphate (2M3B1PP) stimulierten und den Patienten anschließend Zoledronat als Infusion verabreichten, stimulierten Nicol et al. in ihrer Studie  $\gamma\delta$  T-Zellen in vitro mit ZOL und IL-2 und verabreichten ihren Patienten zweimalig in vivo ZOL, kurz vor und kurz nach dem adoptiven Immunotransfer [2, 7].

Ebenso unterscheiden sich die Studien und teilweise auch die Patienten innerhalb der Studien darin, ob zusätzlich andere Therapien weitergeführt wurden [7, 108], oder eine alleinige Therapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen erfolgte [10, 11]. So erfolgte in der Studie von Nicol et al. bei Patientinnen mit Mamma-CA zusätzlich eine Hormon- oder Chemotherapie [7] und bei Sugie et al. zusätzlich zur Therapie bei Mamma-CA mit  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Chemotherapie mit Letrozol [108], während es zahlenmäßig nur wenige Studien gibt, in denen alleinig  $\gamma\delta$  T-Zellen eingesetzt wurden. Außerdem hatten Patienten, die in den Studien aufgenommen waren, oft bereits sehr weit fortgeschrittene Stadien ihrer Erkrankung und waren zudem schon vor Beginn der Therapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen resistent auf mehrere, andere Therapieformen [109]. Kunzmann et al. zeigten in ihrer Studie mit 21 Patienten außerdem, dass sich die Effektivität der Tumorthherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen auch je nach behandelter Tumorart unterscheidet. So zeigte sich bei hämatologischen Tumoren im Vergleich zu soliden Tumoren ein besseres Ansprechen, wobei die Parameter, die zur Diskriminierung des Ansprechens angewandt wurden, die Antwort-Rate des Tumors eingeteilt nach den „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ (RECIST) (Version 1.0) und die „International Working Group Response Criteria for AML“ für hämatologische Tumoren waren [11].

### VEGF und IL-17

Auf der Suche nach weiteren Faktoren, die eine zellbasierte Tumorthherapie beeinflussen könnten, wäre die Studie von Kunzmann et. al zu erwähnen, die zeigt, dass eine Immuntherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Patienten zu einer erhöhten Konzentration an vasoepithelalem Wachstumsfaktor (VEGF) führt und dass dies, so vermuteten die Studienleiter, als eine der Ursachen angesehen werden kann, warum bei diesen Patienten keine Tumorregression zu verzeichnen war [11].

Außerdem führte eine erhöhte  $\gamma\delta$  T-Zell-Aktivität durch ZOL-Stimulation auch zu einer erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B.  $\text{INF}\gamma$ ). Kunzmann et al. vermuteten daher, dass diese TH1-Zelltyp-Zytokine zu einem weiteren Anstieg des tumorfördernden VEGF führen könnten [11].

Dies ist ein extrem wichtiger Befund, denn es zeigt sich, dass TCR-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl IL-17 als auch  $\text{INF}\gamma$  sezernieren [71].

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, zeigten auch Wakita et al., dass IL-17, welches von  $\gamma\delta$  T-Zellen produziert wurde, zu einer erhöhten Produktion der Pro-(Tumor)-Angiogenese-Faktoren VEGF und Angiotensin 2 führte [65]. Patil et al. zeigten, dass bei Patienten mit Gallenblasenkarzinom im Gegensatz zu gesunden Probanden sowohl im peripheren Blut als auch in der Tumorumgebung eine erhöhte Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Zellen vom IL-17-Typ nachweisbar war [63]. Auch sie zeigten, dass IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen für die protumoröse Angiogenese verantwortlich waren [63].

Da es bei der low-dose Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren zur Hemmung von VEGF-R bei Brustkrebspatientinnen ein besseres outcome als bei der high-dose Therapie gab, untersuchten Zhang et al., was die Ursache hierfür sein könnte. Es zeigte sich eine erhöhte Anzahl von IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen bei der high-dose Therapie, während die low-dose Therapie zu einer erhöhten Anzahl  $\text{INF}\gamma$ -positiver  $\gamma\delta$  T-Zellen führte [110]. Sie führten also das schlechtere outcome bei der high-dose-Therapie auf eine Aktivierung von Neutrophilen vom N2-Typ (also Pro-Tumor-Neutrophile) durch IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen zurück [110]. Eine direkte Suppression von  $\alpha\beta$  T-Zellen durch IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden [110]. Die Ergebnisse eines Ko-Kultur-Experimentes sprechen eher für eine indirekte Suppression von  $\alpha\beta$  T-Zellen über die N2-Typ-Neutrophilen, welche durch IL-17- $\gamma\delta$  T-Zellen aktiviert werden [110].

### Hypoxie im TME

Sheshbabu et al. zeigten, dass außerdem Hypoxie zu einer Entwicklung von  $\gamma\delta$  T-Zellen vom IL-17-Typ führte [111]. Für viele Tumoren hat Hypoxie einen wachstumsfördernden Einfluss. Siegers et al. zeigten bei einer Untersuchung von

$\gamma\delta$  T-Zellen in der Umgebung von Brustkrebstumoren, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen in hypoxischen Bereichen vorkommen [112].  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten unter Hypoxie-Bedingungen bessere zytolytische Aktivität als unter Normoxie-Bedingungen [112]. Allerdings führte eine Präinkubation der Brusttumorzellen unter Hypoxie-Bedingungen dazu, dass die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen aufgehoben wurde [112]. Siegers et al. vermuteten eine vermehrte Sekretion von freiem MICA durch die Tumorzellen unter Hypoxie, welche die Zytotoxizität von  $\gamma\delta$  T-Zellen aufheben konnte [112]. Aehnlich et al. zeigten auch unter Hypoxie-Bedingungen eine gleichbleibende Zytotoxizität von IL-2/IL-15-stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber Tumorzellen [86]. Bei Sureshbabu et al. zeigten  $\gamma\delta$  T-Zellen unter Hypoxie-Bedingungen allerdings eine reduzierte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Oralcell-Cancer), auch wenn sich zunächst unter Hypoxie keine verringerte Aktivierung (CD69, CD25) der  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigte [111]. Passend zur verminderten Zytolyse, reduzierte Hypoxie die Expression des Degranulationsmarkers CD107 [111]. Eine Verringerung der Expression dieses Markers spricht ebenfalls für eine Verringerung der Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber den Tumorzellen.

#### Effektor-Target-Ratio

Ein weiterer Aspekt, der für ein niedriges Ansprechen der Therapie sorgen könnte, ist der Fakt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut nur in geringer Anzahl vorliegen und daher durch die Expansion gewisse Zellzahlen erreicht werden müssen, damit eine effektive Therapie durchgeführt werden kann. Bei Olofson et al. zeigte sich zwar bereits eine erfolgreiche Zytolyse bei einer Effektor:Target-Ratio (E:T) von 1:1, allerdings konnte diese Zytolyse durch eine Erhöhung der E:T auf 3:1 verbessert werden [41]. Gleiche Effekte zeigten sich bei Tomogane et al., wo eine Zytolyse der Tumorzellen bei einer E:T von 1:1 erreicht werden konnte, welche sich aber bei einer E:T von 10:1 deutlich verbesserte [73]. Bei Schilbach et al. zeigte sich eine effizientere Zytolyse bei einer E:T von 5:1 als bei der E:T von 1:1 bei ZOL-stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber ZOL-stimulierten U251-Tumorzellen [84]. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei einer Stimulation der Zellen mit IL-2, IL-12 und IL-18 zur Prüfung der Zytotoxizität gegenüber Ewing-Sarkom-Tumorzellen (A673) [71]. Die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen hing auch hier (außer

bei einer Kombination aus IL-2, IL-12 und IL-18) von der E:T ab und eine E:T von 5:1 führte zu einer besseren Zytotoxizität als eine E:T von 0,5:1 [71]. Hier zeigte nur die Zellpopulation nach kombinierter Stimulation der drei Zytokine eine Zytolyse der Tumorzellen [71].

Bei Traxlmayr et al. führte allerdings auf der anderen Seite eine höhere Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Effektorzellen auch zu einer vermehrten Immunsuppression durch eine Hemmung der Proliferation von CD4-T-(Target)zellen [113]. Auch Casetti et al. zeigten, dass die durch IL-2, IPP, IL-15 und TGF- $\beta$  induzierte Immunsuppression von  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber PBMCs stark von der E:T abhängig war und die E:T von 1:1 am effektivsten war [36].

Bei Beaston et al. konnte bei soliden Tumoren nach i.v.-Applikation von ZOL-stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen (+/- TGF- $\beta$  und IL-2) keine ausreichende Wirksamkeit gegenüber den Tumoren erreicht werden, obwohl diese Wirksamkeit bei hämatologischen Tumoren erreicht werden konnte [114]. Eine Untersuchung der Mäuse zeigte, dass nach i.v.-Applikation die meisten  $\gamma\delta$  T-Zellen ins Knochenmark und nicht in die Tumorumgebung migrierten [114]. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei einer direkten Applikation in das Tumorgebiet eine größere Effizienz bei der Bekämpfung des Tumors durch eine ausreichende Anzahl an Immunzellen erreicht werden könnte, was im Gegensatz dazu bei einem adoptiven Immuntransfer mit Gabe der Zellen über das periphere Blut oft vielleicht nicht gewährleistet werden kann.

#### Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Phosphoantigenen und Bisphosphonaten und die Rolle von Butyrophilin-Rezeptoren

Mechanismen, wie die Stimulation und Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit Phosphoantigenen, wie IPP [10] oder mit Bisphosphonaten wie ZOL [3, 7, 11] wurden schon oft durchgeführt und ihre zytolytischen Effekte überprüft.

Gong et al. beschrieben, dass eine Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit IL-2 und Phosphoantigenen zu einer Suppression der Expansion von Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) führen kann, während eine Stimulation der beiden Zellgruppen mit IL-2 allein zu einer Suppression der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch die Treg führte [68]. Gleichzeitig

zeigten sie, dass INF $\gamma$ -AK und nicht TGF- $\beta$ -AK zu einer Verminderung der Suppression von Treg durch  $\gamma\delta$  T-Zellen führte [68].

Beatson et al. zeigten eine durch Stimulation mit TGF- $\beta$  und ZOL hervorgerufene erhöhte Zytotoxizität von  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber U937 und KG-1 Tumorzellen im Vergleich zu den nur mit ZOL und IL-2 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen [114]. Zusätzlich wurden die Tumore teilweise vorher mit Pamidronat oder Zoledronat gepulst, um die Erkennung durch  $\gamma\delta$  T-Zellen zu erleichtern [114].

Capietto et al. beschrieben, dass eine Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit TGF- $\beta$  eine hemmende Wirkung nicht auf die Aktivierung, sondern auf die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen haben kann, so wie sie bereits für  $\alpha\beta$  T-Zellen und NK-Zellen beschrieben ist [115]. Dies äußerte sich in einer verminderten Zytotoxizität gegenüber Lymphomzellen. Eine gleichzeitige Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer erhöhten Dosis Phosphoantigen (BrHpp) führte allerdings dazu, dass die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Form von endogener IL-2-Produktion weiterhin aufrechterhalten werden konnte [115].

Olofson et al. zeigten, dass die Inkubationszeit mit ZOL einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen hatte. Eine längere Inkubationszeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit ZOL führte zu einer effizienteren Zytolyse [41]. Zusätzlich griffen die  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit ZOL zwar Tumorzellen an und zytolysierten diese, aber sie griffen keine eigenen, gesunden Lymphozyten an [41].

Neuere Studien zeigen eine Beteiligung der Oberflächenrezeptoren der Butyrophilin (BTN)-Familie bei der Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen [116-118]. Es wurde vermutet, dass bei der Erkennung von Phosphoantigenen ein zusätzlicher antigenpräsentierender Rezeptor eine Rolle spielt. Es zeigte sich dann, dass BTN-Moleküle hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Harley et. al beschrieben in ihrer Studie, dass ein Antikörper gegen die 20.1 Domäne des BTN-Rezeptors (Anti-CD 277-AK) zu einer Aktivierung von V $\delta$ 2- $\gamma\delta$  T-Zellen führte. Sie führten dies allerdings auf eine indirekte Aktivierung zurück, was bedeutet, dass der AK an der Zielzelle zu einer indirekten Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen führt [117]. Rhodes et al. zeigten, dass sowohl IPP als auch HMBPP an die 30.2-Domäne des BTN3A1-Rezeptors binden [116]. In neueren Studien

wurde gezeigt, dass Phosphoantigene, wie z.B. IPP über Bindung an die intrazelluläre 30.2-Domäne des BTN3A1-Rezeptors eine Konformationsänderung und dadurch eine Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen hervorrufen [118]. Es gibt allerdings auch Vermutungen, dass IPP über Transporter in der Zellmembran aus der Zelle heraus transportiert wird und im Anschluss an den extrazellulären Teil des BTN3A1-Rezeptors bindet [119]. Castella et al. zeigten, dass der ABC-cassette binding transporter (ABCA1) die Menge an extrazellulärem IPP nach ZOL-Stimulation von dendritischen Zellen förderte [119]. Sie vermuteten eine Rolle dieses Transporters bei der durch extrazelluläres IPP hervorgerufenen Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen [119]. BTN3A1 hatte hingegen eher Einfluss auf den intrazellulären IPP-Gehalt der DC und weniger auf den extrazellulären IPP-Gehalt der DC [119]. Ein Ausschalten der beiden Rezeptoren führte dazu, dass die Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen massiv verringert wurde [119].

Viele Tumoren exprimieren BTN-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche [84, 116]. Eine Stimulierung von Tumorzellen durch den 20.1-AK führte dazu, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen diese Tumorzellen besser abtöten konnten als in einem Setting ohne vorherige Behandlung der Tumorzellen mit einem Antikörper [117].

Rigau et al. zeigten, dass BTN2A1 und nicht BTN3A1 an die  $\gamma$ -Untereinheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen bindet [83]. Im Gegensatz zu BTN3A1 zeigte sich bei BTN2A1 allerdings nicht, dass Phosphoantigene an die auch bei BTN2A1 vorhandene, intrazelluläre 30.2-Domäne binden und so zur Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen beitragen [83]. Durch BTN2A1 ist zwar ein physiologischer Ligand der  $\gamma$ -Kette des  $\gamma\delta$ -TCR bekannt, trotzdem bleibt weiterhin ungeklärt, was physiologische Liganden der  $\delta$ -Untereinheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen sind.

#### Autologe Immunsuppression durch $\gamma\delta$ T-Zellen versus Tumorzytolyse

Eine weitere Vermutung für das fehlende verbesserte outcome nach Therapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen ist, dass durch Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen gleichzeitig zur Induktion der zytotoxischen Aktivität eine Induktion eines immunsupprimierenden Effekts durch  $\gamma\delta$  T-Zellen stattfindet [36]. Interessant ist der Aspekt, durch welche

Stimulationsform einerseits ein Anti-Tumoreffekt und andererseits ein immunsupprimierender Effekt durch  $\gamma\delta$  T-Zellen hervorgerufen werden kann.

#### Untouched und bypass-Stimulation

Diese Arbeit beschreibt zwei Stimulationsformen, die ohne Einbeziehung des  $\gamma\delta$ -TCR wirken. Unter anderem die Negativ-Isolation und fehlende Stimulation von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen (untouched) und die simultane bypass-Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18. Hierbei wurde festgestellt, dass weder untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen noch bypass-stimulierte V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen eine Suppression der Proliferation bei autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen hervorrufen konnten. Trotz fehlender Signifikanzen kann allerdings eine Tendenz im Zusammenhang zwischen der Stärke der TCR-Stimulation und der Stärke der Proliferationshemmung von V $\delta$ 2 T-Zellen auf autologe  $\alpha\beta$  T-Zellen erkannt werden, wenn man die beiden in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsformen in einen größeren Zusammenhang mit anderen Stimulationsformen setzt, so wie es durch Schilbach et al. erfolgte [84].

Schilbach et al. setzten die in dieser Arbeit aufgezeigten Stimulationsmodi in den Kontext mit sechs weiteren Stimulationsformen und konnten hier signifikante Unterschiede in der Suppression der Proliferation erkennen [84].

Bezogen auf die eingesetzten löslichen Faktoren, die ein Milieu charakterisieren, konnte gezeigt werden, dass IL-15 die Suppression steigert, während IL-12 und TGF- $\beta$  eher zu einer Erniedrigung des Suppressions-Potentials führten [84]. Durch Casetti et al. war beschrieben worden, dass V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen, nachdem sie mit IPP, IL-15 und TGF- $\beta$  stimuliert wurden, eine Suppression bei PBMCs hervorriefen [36]. Aehnlich et al. wiederum zeigten, dass IL-2/IL-15-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber mit ZOL-gepulsten Tumorzellen im Vergleich zu nur IL-2 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aufweisen [86]. Dabei zeigten sie auch, dass IL-15 die INF $\gamma$  Produktion nicht signifikant beeinflusst [86]. Außerdem führte IL-15-Stimulation zu einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und steigerte in Kombination mit IL-2 die Proliferation [86].

Van Acker et al. konnten eine erhöhte Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit IL-15 und IPP feststellen [120]. Außerdem zeigten sie in ihrer

Studie eine Produktion von INF $\gamma$  und TNF $\alpha$  (TH1-Typ) nach Stimulation mit IL-15 und IPP [120]. Gleichzeitig fiel allerdings auch eine erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  auf, was eher für den regulatorischen T-Zelltyp spricht [120]. Außerdem erhöhte die Zugabe von IL-15 zu IPP bzw. ZOL signifikant das zytotoxische Potential der  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber Tumorzellen (U266 und Daudi) [120].

Skeen und Ziegler beschrieben, dass unter anderem IL-12 zu einer sogenannten bypass-Stimulation führt, die TCR-unabhängig ist [90]. Ebenso fanden Domae et al. heraus, dass eine TCR-unabhängige Aktivierung von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen durch IL-12 und IL-18 eingeleitet werden kann. Trotzdem zeigten in den hier veröffentlichten Ergebnissen die mit IL-12, IL-15 und IL-18 stimulierten V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen keine signifikant erhöhte negative Wirkung (z.B. Suppression) im Vergleich zu untouched V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen. Hier ließ sich deutlich erkennen, dass im Gegensatz zur Stimulation mit IPP-, IL-12- und IL-15-stimulierten Zellen trotz Aktivierung keine Suppression durch aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen erfolgt und zur Entwicklung suppressiven Potentials eine TCR vermittelte Simulation notwendig ist, die in den Experimenten allerdings als supraphysiologisch einzuordnen ist [84].

IL-12 als ein den TH1-Subtyp stimulierendes Zytokin führt zu einer vermehrten INF $\gamma$  Produktion bei  $\gamma\delta$  T-Zellen [121]. Im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T-Zellen differenzieren sich  $\gamma\delta$  T-Zellen unter dem simultanen Einfluss der Zytokine IL-12 und IL-4 hauptsächlich zu TH1-Zellen, was darauf hinweisen könnte, dass im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T-Zellen bei  $\gamma\delta$  T-Zellen IL-12 einen dominanteren Einfluss auf die Entwicklung der Zellen hat als IL-4 [121].

In einer ex vivo Studie von Traxlmayer et al. wurde der Effekt von IL-12 sezernierenden dendritischen Zellen auf V $\delta$ 2- $\gamma\delta$  T-Zellen des peripheren Blutes überprüft [113]. Es zeigte sich, dass diese dendritischen Zellen im Gegensatz zu nicht-IL-12-sezernierenden dendritischen Zellen die Proliferation und Aktivierung (CD25<sup>+</sup>) der V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen förderten [113]. Außerdem konnte in der Ko-Kultur von IL-12 sezernierenden dendritischen Zellen eine Hemmung von Aktivierung und Proliferation der CD4 und CD8 T-Zellen gezeigt werden [113]. Nach Stimulation der CD4 und CD8 T-Zellen mit Ovalbumin wurde zunächst eine

Proliferation dieser Zellen festgestellt [113]. Durch Zugabe von IPP wurde diese Proliferation allerdings gehemmt und es kam zu einem Rückgang der Zellzahl vor allem bei CD4-T-Zellen [113]. Eine Hemmung der Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen konnte allerdings nur im Zusammenhang mit IPP und IL-12 sezernierenden dendritischen Zellen festgestellt werden [113]. IPP im Zusammenhang mit nicht-IL-12 sezernierenden dendritischen Zellen führte zu keiner Proliferationshemmung [113]. Außerdem wurde im Anschluss hieran eine direkte suppressive Wirkung von IPP auf die Immunzellen durch Depletion von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Kultur festgestellt [113]. Die Studie von Traxlmayer et al. zeigt also, dass IL-12 auch unabhängig von anderen Stimulanzen wie IPP eine Rolle bei der Suppression anderer Immunzellen, wie CD4 und CD8 T-Zellen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen spielt.

Bei Ribot et al. führte eine Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit IL-2 und IL-12 zu einer erhöhten Produktion von INF $\gamma$ -produzierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen [72]. Hier wiederum wurde gezeigt, dass IL-2 allein eine INF $\gamma$  Produktion hervorrufen konnte, während eine Kombination aus IL-2 und TGF- $\beta$  zu einer Aufhebung der INF $\gamma$  Produktion durch  $\gamma\delta$  T-Zellen führte [72]. IL-2 und IL-15 konnten außerdem ohne zusätzliche TCR-Aktivierung eine TH1-like-Zelltyp bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen hervorrufen, d.h. sie führten zu einer INF $\gamma$  und TNF $\alpha$ -Produktion, sowie zu einer Erhöhung von T-bet und Perforin [72]. Unter Stimulation vieler Zytokine (u.a. IL-2, IL-7, IL-12 und IL-15) riefen vor allem IL-2 und IL-15 eine INF $\gamma$  Produktion hervor [72].

Tsai et al. zeigten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit IL-18 TCR-unabhängig eine wichtige Quelle für INF $\gamma$  als Immunreaktion nach Infektion mit Dengue Virus darstellten [122]. IL-18 steigerte somit die zytotoxische Wirkung von  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber mit Dengue-Virus-infizierten dendritischen Zellen [122].

Tsuda et al. konnten zeigen, dass eine Stimulation von PBMC mit IL-2, IL-18 und ZOL zu einer Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 14 Tagen führte [123]. Es konnte ein Unterschied in der Wirksamkeit der Stimulationsform auf die Expansion zwischen der Inkubation der PBMC nur mit ZOL und IL-2 und der Inkubation mit zusätzlich IL-18 gezeigt werden, da die Zugabe von IL-18 zu einer vermehrten

Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen führte [123]. Bei Tsuda et al. führte außerdem nicht nur eine Inkubation der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit IL-18 zu einer vermehrten INF $\gamma$  Produktion, sondern auch ZOL, IL-2 und IL-18 in Kombination zu einer verstärkten Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren (unter anderem CCR5 und CCR7) [123]. Im Rahmen von viralen Infektionen (z.B. Influenza-Virus) migrieren  $\gamma\delta$  T-Zellen, die CCR5 auf ihrer Oberfläche tragen zu virusinfizierten Zellen und bekämpfen diese mit zytolytischen Proteinen (wie z.B. Granzyme oder Perforin) [124].

Auch bei Li et al. führte eine Kombination aus IL-2, ZOL und IL-18 zu einer Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen. [125] Die Zugabe eines anti-ILR-18-AK bewirkte eine Hemmung der Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen, was dafürspricht, dass IL-18 an der Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen beteiligt ist. Außerdem zeigten Li et. al eine erhöhte Produktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit IL-18, u.a. eine erhöhte Produktion von INF $\gamma$  [125]. Außerdem führte die Stimulation mit IL-18, ZOL und IL-2 zu einer erhöhten Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber Mesotheliomtumorzellen, was vermutlich durch eine vermehrte Expression des Oberflächenmarkers NKG2D auf  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Stimulation hervorgerufen wurde [125].

Schilbach et al. fanden heraus, dass eine Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer Kombination aus IL-2, IL-12 und IL-18 eine eindeutige TH1-Differenzierung zur Folge hatte [71]. Die Stimulation mit den kombinierten Zytokinen führte zu einer erhöhten INF $\gamma$  Produktion, während eine Produktion von IL-17 und IL-4 (TH2-Differenzierungstyp) ausblieb [71]. Auch, wenn sich die Produktion von INF $\gamma$  durch einen zusätzlichen TCR-Stimulus erhöhte, war eine reine Zytokinstimulation mit einer Kombination aus IL-2, IL-12 und IL-18 ausreichend, um die INF $\gamma$  Produktion bei untouched  $\gamma\delta$  T-Zellen auszulösen [71].

Die Entwicklung hin zu einem INF- $\gamma$  produzierenden TH1-Zelltyp kann sowohl auf eine anti-tumorale (u.a. Hemmung der Metastasierung und Induktion von Apoptose bei Tumorzellen) als auch auf eine tumorfördernde Funktion (u.a. PD-L1 Hochregulation auf Tumorzellen) der  $\gamma\delta$  T-Zellen hinweisen [126].

Während nTreg sich phänotypisch dadurch auszeichnen, dass sie grundlegend FoxP3 exprimieren [25], konnte bei Schilbach et al., genauso wie bei Peters et al. [101] nicht nachgewiesen werden, dass nicht mit Zytokinen stimulierte, frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen FoxP3 exprimieren [84]. Diese Tatsache könnte erklären, warum die untouched Kohorte in dieser Arbeit keinen suppressiven Charakter zeigt. Allerdings zeigten bei Schilbach et al. andere Zellpopulationen ebenfalls keine FoxP3-Expression, während sie trotzdem aktivierte, autologe  $\alpha\beta$  T-Zellen supprimierten, was eher dafür spricht, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen einen anderen suppressiven Phänotyp aufweisen [84, 101]. Casetti et al. zeigten hingegen bei IL-2, IPP, TGF- $\beta$  und IL-15 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Expression von FOX-P3 und gleichzeitig ein suppressives Potential, weshalb sie eine Ähnlichkeit zwischen nTreg und regulatorischen  $\gamma\delta$  T-Zellen vermuteten. Auch Casetti et al. zeigten aber bei  $\gamma\delta$  T-Zellen in frisch-isolierten PBMCs keine FOX-P3-Expression [36].

Bei einem Vergleich der bei Peters et al. untersuchten und den in dieser Arbeit untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zellen ist außerdem zu beachten, dass die bei Peters et al. untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zellen im Gegensatz zu der in dieser Arbeit untersuchten untouched-Zellpopulation nicht negativ-isoliert wurden, sondern durch anti- $\gamma\delta$ -TCR-beads positiv isoliert wurden. Es hat daher schon ein einmaliges TCR-crosslinking stattgefunden, während dies bei den in dieser Arbeit gezeigten  $\gamma\delta$  T-Zellen und den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus frisch-isolierten PBMCS bei Casetti et al. nicht der Fall ist [36, 101].

Bei der Recherche zu dieser Arbeit ließen sich nur wenige Studien finden, die generell aber auch im Zusammenhang von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen und ihrem immunsuppressiven, regulatorischen Potential auch negativ isoliert haben. Negativ isoliert heißt, dass eine magnetische Isolation ohne Antikörper gegen den  $\gamma\delta$ -TCR durchgeführt wurde, um das Risiko einer akzidentiellen Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch einen TCR-Stimulus zu vermeiden [71, 84, 120, 127]. Die häufigere Isolationsform ist die der positiven Isolation mit Hilfe eines anti- $\gamma\delta$ -TCR-AK [63, 72, 101, 111, 115, 122, 123]. Es zeigt sich bei Schilbach et al. ein eindeutiger Unterschied zwischen der untouched Zellpopulation, die negativ isoliert wurde und der positiv isolierten Zellpopulation, welche nach dieser

einmaligen cross-link-Aktivierung des  $\gamma\delta$ -TCR zu einer Aktivierung und anschließender Inhibierung der Proliferation autologer  $\alpha\beta$  T-Zellen führte [84].

Während die bei Schilbach et al. präsentierten untouched Zellpopulationen weder mit IL-2 noch mit IL-7 stimuliert wurden [84], wurden die untouched Zellpopulationen in dieser Arbeit mit IL-2 und IL-7 low dose für 20 h über Nacht stimuliert, um ein Absterben während der Kultivierung zu vermeiden. IL-7 ist ein Zytokin, das für die Aufrechterhaltung der Homöostase vieler Immunzellen, u.a. B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen bekannt ist [128]. Bei T-Zellen sorgt es unter anderem für eine unterstützte Proliferation im Kontext mit IL-2 und hat anti-apoptotische Einflüsse [128].

Ribot et al. konnten eine TH1-Differenzierung von V $\delta$ 2 T-Zellen (INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Produktion) durch Stimulation mit IL-2 und IL-7 zeigen [72]. Allerdings sind die von ihm eingesetzten Konzentrationen höher als die zum survival eingesetzten Konzentrationen in den für diese Arbeit über Nacht inkubierten Kulturen. Sie setzten 10ng/ml IL2 und 10ng/ml IL7 ein [72]. Außerdem nutzten Ribot et al. das Prinzip der positiven Selektion zur Isolierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit anti- $\gamma\delta$ -TCR-Partikeln, während in dieser Arbeit das Prinzip der negativen Selektion verwendeten. Wie bei Schilbach gezeigt, kann eine einmalige Aktivierung der Zellen durch TCR-crosslinking zu einem suppressiven Zelltyp führen und eine akzidentelle Aktivierung des  $\gamma\delta$ -TCR bei Ribot et al kann die INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Produktion erklären [84]. Die Studie von Ribot et al. zeigte darüber hinaus, dass eine Kombination aus IL-2 und IL-7 für die Produktion von INF $\gamma$  und TNF $\alpha$  notwendig ist und IL-7 alleine diese nicht hervorrufen konnte [72].

Michel et. al zeigten, dass IL-7 eine Rolle bei der Proliferation und Aktivierung von IL-17 produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen spielte [129]. Wie bereits erwähnt kann von  $\gamma\delta$  T-Zellen produziert IL-17 das Wachstum von Tumoren fördern [65].

Wie bereits in der Einleitung kurz erwähnt, zeigten Peters et al., dass eine Suppression von responder-T-Zellen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen in Ko-Kultur besser funktionierte als in Transwell-Experimenten. Sie vermuteten daher eine Suppression der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch direkten Zellkontakt zu den responder-T-Zellen. [101]. In dieser Arbeit konnte eine Tendenz aufgezeigt

werden, dass auch die PD-L1 Expression auf V $\delta$ 2 T-Zellen abhängig von der Art der Stimulation der V $\delta$ 2 T-Zellen ist. Während die PD-L1-Expression in frischen, negativ-isolierten V $\delta$ 2 T-Zellen kaum nachweisbar war, führte eine simultane Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 zu einer im Vergleich signifikant höheren PD-L1 Expression. (**Abbildung 32**) Dies wird außerdem bestätigt, durch Schilbach et al., die eine Korrelation zwischen PD-L1 Expression im FACS und suppressivem Potential bei V $\delta$ 2 T-Zellen beschreiben [84]. Außerdem konnten sie durch gezielte Blockierung von PD-L1 mittels Pembrolizumab ( $\alpha$ -PD1) eindeutig diesen suppressiven Effekt signifikant reduzieren [84]. Die Ergebnisse von Schilbach et al. [84] sind gleichsinnig zu dem, was Peters et al. zeigten. Sie konnten nachweisen, dass eine PD-L1-Blockade bei V $\delta$ 2 T-Zellen zu einer deutlichen Reduktion des suppressiven Potentials führt [101].

Daley et al. konnten zeigen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, dass tumorinfiltrierende  $\gamma\delta$  T-Zellen im Mausmodell bei Pankreas-Karzinomen einen positiven Einfluss auf das Tumorstadium hatten [1]. Eine Depletion der  $\gamma\delta$  T-Zellen hingegen führte dazu, dass ein Wachstum der Pankreastumorzellen verhindert werden konnte [1]. Der entscheidende Bogen zwischen Immunsuppression und Tumorstadium lässt sich ziehen, da Daley et al. zeigen konnten, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen über direkten Zell-Zell-Kontakt in der Tumorumgebung zu einer verminderten Anzahl an den Tumor bekämpfenden CD4 und CD8 T-Zellen führen [1]. Sowohl  $\gamma\delta$  T-Zellen in PBMCs wie auch tumorinfiltrierende  $\gamma\delta$  T-Zellen wiesen im Gegensatz zu gesunden Spendern eine erhöhte Expression von PD-L1 auf [1]. Die Vermutung, dass die Suppression von CD4 und CD8  $\alpha\beta$  T-Zellen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen auch bei Daley et al. über die PD-L1 Achse stattfand, wurde dadurch bestätigt, dass der suppressive Effekt (Verhinderung der Aktivierung von  $\alpha\beta$  T-Zellen) durch eine Blockade von PD-L1 aufgehoben werden konnte [1].

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss der beiden Stimulationsformen auf die PD-1 Expression von V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen gezeigt werden. Hoeres et al. zeigten in ihrer Studie zum adoptiven Immuntransfer mit  $\gamma\delta$  T-Zellen bei akuter, myeloischer Leukämie eine Hochregulation von PD-1 nach Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen durch ZOL und IL-2 [130]. Hoeres et al. vermuteten daher einen Zusammenhang

zwischen der PD-1 Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen und der Aktivierung des  $\gamma\delta$ -TCR durch Stimulation [130]. Auch bei Schilbach et al. kam es unter Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit IPP zu einer erhöhten Expression von PD-1 auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen [84]. Allerdings war auch bei bypass-stimulierten Zellen eine Erhöhung der PD-1 Expression festzustellen, obwohl keine direkte TCR-Stimulation vorlag [84]. Wichtig in diesem Kontext ist aber, dass zeitgleich eine Hochregulation von PD-L1 auf V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen vorliegt, die ein signaling in PD-1 exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen, durch Interaktion zwischen cis-exprimiertem PD-1 und cis-exprimiertem PD-L1, wahrscheinlich komplett unterbinden.

Die Bedeutung der beiden Rezeptoren PD-L1 und PD-1 im Kontext der Tumorthherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen wird in Studien deutlich, die zeigen, dass Immuncheckpoint-Inhibitoren (also u.a. anti-PD-1-Antikörpern) und adoptiver Transfer von  $\gamma\delta$  T-Zellen eine bessere Ansprechrate in der Tumorzelltherapie erzielen können [131].

Bei Iwasaki et al. bewirkt eine Expression von PD-1 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen einen negativen Effekt auf ihre Zytotoxizität gegenüber PD-L1 tragenden Tumorzellen [132]. Dieser Effekt konnte durch einen PD-L1-AK wieder aufgehoben werden [132]. Sie vermuteten außerdem, dass eine starke Stimulation des  $\gamma\delta$ -TCR in der Lage sei die Blockade von PD-1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen durch die PD1/PD-L1-Achse aufzuheben [132]. Yang et al. zeigten, dass die Zugabe eines bispezifischen Antikörpers (PD-L1/CD3) zu einer verbesserten Antitumoraktivität bei V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen führt. [127] Bei Castella et al. weisen  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Patienten mit multiplen Myelom eine Expression von PD-1 auf [133]. Eine Blockade von PD-1 mithilfe eines AK führte zu einer vermehrten Proliferation und Aktivierung (CD107) von ZOL/IL-2-stimulierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen [133]. Die Zugabe eines PD-1-AK ohne zusätzliche Stimulation mit ZOL führte nicht zu diesem Effekt [133].

Nada et al. konnten zeigen, dass durch eine zusätzliche Gabe des PD-1 AK zum adoptiven Immuntransfer mit V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen im Mausmodell das Wachstum von PD-L1 exprimierenden Prostata-Tumorzellen effizient hemmen konnte [131].

All diese Studien bestätigen die Annahme, dass eine Verbesserung der Tumorthherapie durch gleichzeitige Gabe von Immunocheckpoint-Inhibitoren (wie z.B. PD-1-AK oder PD-L1-AK) möglich sein könnte.

Abschließend lässt sich also sagen, dass weiterhin die Etablierung einer effektiveren Stimulationsform und der daraus resultierende verbesserte Effekt von adoptiven Immuntransfers mit  $\gamma\delta$  T-Zellen im Fokus aktueller Studien stehen sollten.

Die Forschung in Richtung der Untergruppe der V $\delta$ 1 T-Zellen zu intensivieren, scheint außerdem vielversprechend. Viele ihrer TCR Liganden sind bisher unbekannt, jedoch verfügt auch diese  $\gamma\delta$  T-Zell-Entität über zytolytisches Potential gegenüber Tumorzellen. Correia et al. konnten eine Zytotoxizität von V $\delta$ 1 T-Zellen aus dem peripheren Blut gegenüber Leukämiezellen über NK-Rezeptoren aufzeigen [134]. Allerdings können V $\delta$ 1 T-Zellen andererseits genauso wie V $\delta$ 2 T-Zellen suppressive Funktionen aufweisen und somit unter Umständen tumorfördernd wirken [135]. Bei Schilbach et al. [84] und den Zellpopulationen in dieser Arbeit (untouched und bypass) kann eine zusätzliche Immunsuppression durch V $\delta$ 1 T-Zellen ausgeschlossen werden, da nach Isolation der Pan- $\gamma\delta$  T-Zellen und anschließender Depletion von V $\delta$ 1 Zellen eine Reinheit von im Durchschnitt > 99 % V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden konnte [84].

### Fazit

In dieser Studie konnte keine Induktion von Suppression durch untouched oder bypass-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen aufgezeigt werden. Während untouched  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Schilbach et al. gleichzeitig auch keine Zytotoxizität (im Gegensatz zu TCR-stimulierten = ZOL-stimulierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen) gegenüber verschiedenen Tumorentitäten zeigten [84], konnten auch festgestellt werden, dass IL-2/IL-12/IL-18-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen dazu in der Lage sind, auch ohne zusätzlichen TCR-Stimulus Tumorzellen effizient abzutöten, dass sie dabei jedoch nicht immunsuppressiv sind [71].

Wichtig ist hier nochmals zu betonen, dass in den erwähnten Studien zur Tumortherapie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen bei den durch Phosphoantigene bzw. ZOL-Stimulation aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Stimulation der Zellen über den  $\gamma\delta$ -TCR erfolgt. Diese Stimulation mit IPP bzw. einmaligem TCR-crosslinking rief bei Schilbach et al. auf der anderen Seite allerdings eine Immunsuppression bei autologen  $\alpha\beta$  T-Zellen hervor [84]. Dieser zweiseitige Effekt aus Tumorzytotoxizität und simultaner Immunsuppression kann ein Grund dafür sein, dass sich bisher durch Tumortherapien mit  $\gamma\delta$  T-Zellen nur enttäuschende Ergebnisse erzielen lassen [6].

Die oben beschriebenen, neuen Studien zeigen wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf den adoptiven Immuntransfer und die Tumortherapie mithilfe von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Bereich der  $V\delta 2$  T-Zellen. Damit bleiben  $\gamma\delta$  T-Zellen weiterhin eine Zellgruppe, die es zu untersuchen gilt, da sie abhängig von den Stimulationsmodi ein breit aufgestelltes Bild an Funktionen aufweisen und im Gegensatz zu ihrer klar anti-tumoralen, zytotoxischen Funktion, simultan einen immunsuppressiven Effekt auf die lebensnotwendige, langfristig wirksame, adaptive Immunität haben können.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Stimulationsformen von  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht, die jeweils ohne Einbeziehung ihres  $\gamma\delta$ -TCR erfolgte. Zum einen die als „untouched“ bezeichnete Form, bei der eine negative Isolation der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen erfolgte und zum anderen die als „bypass“ bezeichnete Form, bei der nach der negativen Isolation noch eine Stimulation der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen mit den Interleukinen IL-12, IL-15 und IL-18 erfolgte.

Untersucht wurden bei diesen zwei Kohorten einerseits ihr Potential Apoptose bei autologen, CD3/CD28 aktivierten  $\alpha\beta$  T-Zellen auszulösen und auf der anderen Seite ihr Potential autologe, CD3/CD28 aktivierte  $\alpha\beta$  T-Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren.

Es konnten weder bei der Apoptoseinduktion noch beim immunsuppressiven Potential der V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen den beiden Kohorten aufgezeigt werden.

Des Weiteren wurden die PD-L1 bzw. PD-1 Expression auf „untouched“- bzw. „bypass“- V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T-Zellen auf Protein- und Transkriptomebene untersucht. Dies erfolgte zum einen durch Messung der Oberflächenexpression der Rezeptoren im FACS (Proteom) und zum anderen durch Messung der mRNA-Level der beiden Proteinen PD-L1 und PD-1 in der qPCR (Transkriptom).

Bei der Expression der beiden Rezeptoren in der FACS-Analyse zeigten sich signifikante Unterschiede bei der PD-L1 Expression zwischen der „untouched“- und „bypass“-Zellpopulation (\* $p < 0,05$ ). Bei der PD-1 Expression hingegen zeigten sich im FACS keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten.

Interessanterweise korrelierten mRNA-Level und Proteinexpression von PD-L1 und PD-1 umgekehrt proportional zueinander. Während die mRNA-Level jeweils für PD-L1 und PD-1 bei der „untouched“-Zellpopulation höher waren als bei der „bypass“-Zellpopulation, zeigte sich PD-L1 im FACS genau umgekehrt, nämlich PD-L1 in der „untouched“-Kohorte leicht geringer exprimiert als in der „bypass“-Kohorte.

Da gezeigt werden konnte, dass IL-12/IL-18-stimulierte V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen effizient Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten abtöten können [71], trägt diese Arbeit dazu bei, Wege aus dem Dilemma zu finden, potente V $\delta$ 2 Killerzellen zu transferieren, ohne die gleichzeitige immunsuppressive Wirkung TCR-stimulierter V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen in Kauf nehmen zu müssen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Daley, D., et al., *gammadelta T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining alphabeta T Cell Activation*. Cell, 2016. **166**(6): p. 1485-1499 e15.
2. Kobayashi, H., et al., *Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(4): p. 469-76.
3. Di Carlo, E., et al., *Mechanisms of the antitumor activity of human Vgamma9Vdelta2 T cells in combination with zoledronic acid in a preclinical model of neuroblastoma*. Mol Ther, 2013. **21**(5): p. 1034-43.
4. Lo Presti, E., et al., *Current Advances in gammadelta T Cell-Based Tumor Immunotherapy*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1401.
5. Bennouna, J., et al., *Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(11): p. 1599-609.
6. Zhao, Y., C. Niu, and J. Cui, *Gamma-delta (gammadelta) T cells: friend or foe in cancer development?* J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 3.
7. Nicol, A.J., et al., *Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours*. Br J Cancer, 2011. **105**(6): p. 778-86.
8. Wesch, D., C. Peters, and G.M. Siegers, *Human gamma delta T regulatory cells in cancer: fact or fiction?* Front Immunol, 2014. **5**: p. 598.
9. Zou, C., et al., *gammadelta T cells in cancer immunotherapy*. Oncotarget, 2017. **8**(5): p. 8900-8909.
10. Kunzmann, V., et al., *Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma*. Blood, 2000. **96**(2): p. 384-92.
11. Kunzmann, V., et al., *Tumor-promoting versus tumor-antagonizing roles of gammadelta T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial*. J Immunother, 2012. **35**(2): p. 205-13.
12. Nakajima, J., et al., *A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **37**(5): p. 1191-7.
13. Kobayashi, H., et al., *Phase I/II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(8): p. 1075-84.
14. Liotta, F., et al., *Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma*. BJU Int, 2011. **107**(9): p. 1500-6.
15. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
16. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.

17. Okazaki, T. and T. Honjo, *The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance*. Trends Immunol, 2006. **27**(4): p. 195-201.
18. Tsushima, F., et al., *Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy*. Blood, 2007. **110**(1): p. 180-5.
19. Park, J.J., et al., *B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance*. Blood, 2010. **116**(8): p. 1291-8.
20. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
21. Malek, T.R. and I. Castro, *Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity*. Immunity, 2010. **33**(2): p. 153-65.
22. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
23. Chaudhry, A., et al., *Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 566-78.
24. Yang, W.C., et al., *Interleukin-4 Supports the Suppressive Immune Responses Elicited by Regulatory T Cells*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1508.
25. Rodriguez-Perea, A.L., et al., *Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents*. Clin Exp Immunol, 2016. **185**(3): p. 281-91.
26. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
27. Chikuma, S., et al., *PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6682-9.
28. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
29. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett, *Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 657-79.
30. Bayer, A.L., A. Pugliese, and T.R. Malek, *The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation*. Immunol Res, 2013. **57**(1-3): p. 197-209.
31. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
32. Barthlott, T., et al., *CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production*. Int Immunol, 2005. **17**(3): p. 279-88.
33. Woo, E.Y., et al., *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4766-72.

34. Saito, T., et al., *Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 679-84.
35. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
36. Casetti, R., et al., *Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3574-7.
37. Kabelitz, D., et al., *Regulatory functions of gammadelta T cells*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(3): p. 382-7.
38. Fichtner, A.S., S. Ravens, and I. Prinz, *Human gammadelta TCR Repertoires in Health and Disease*. Cells, 2020. **9**(4).
39. Zhao, Y., et al., *Protective Role of gammadelta T Cells in Different Pathogen Infections and Its Potential Clinical Application*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 5081634.
40. Minton, K., *T cell development: Shaping organ-specific gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(11): p. 658-659.
41. Holmen Olofsson, G., et al., *Vgamma9Vdelta2 T Cells Concurrently Kill Cancer Cells and Cross-Present Tumor Antigens*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 645131.
42. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
43. Wesch, D., et al., *Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(14): p. 2357-70.
44. Devilder, M.C., et al., *Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3625-33.
45. Chennupati, V., et al., *Notch Signaling Regulates the Homeostasis of Tissue-Restricted Innate-like T Cells*. J Immunol, 2016. **197**(3): p. 771-82.
46. Gogoi, D., A.A. Dar, and S.V. Chiplunkar, *Involvement of Notch in activation and effector functions of gammadelta T cells*. J Immunol, 2014. **192**(5): p. 2054-62.
47. Van Coppennolle, S., et al., *Notch induces human T-cell receptor gammadelta+ thymocytes to differentiate along a parallel, highly proliferative and bipotent CD4 CD8 double-positive pathway*. Leukemia, 2012. **26**(1): p. 127-38.
48. Couzi, L., et al., *Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa)*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1418-27.
49. Farrington, L.A., et al., *Opsonized antigen activates Vdelta2+ T cells via CD16/FcgammaRIIIa in individuals with chronic malaria exposure*. PLoS Pathog, 2020. **16**(10): p. e1008997.
50. Chien, Y.H., C. Meyer, and M. Bonneville, *gammadelta T cells: first line of defense and beyond*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 121-55.

51. Dunne, M.R., et al., *Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells*. *Mediators Inflamm*, 2010. **2010**: p. 704941.
52. Havlir, D.V., et al., *Selective expansion of human gamma delta T cells by monocytes infected with live Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(2): p. 729-33.
53. Janis, E.M., et al., *Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 1989. **244**(4905): p. 713-6.
54. Kabelitz, D., et al., *A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein*. *J Exp Med*, 1990. **171**(3): p. 667-79.
55. Modlin, R.L., et al., *Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions*. *Nature*, 1989. **339**(6225): p. 544-8.
56. Russo, D.M., et al., *Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis*. *J Immunol*, 1993. **151**(7): p. 3712-8.
57. Raziuddin, S., et al., *Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(5): p. 1143-8.
58. Ryan-Payseur, B., et al., *Multieffector-functional immune responses of HMBPP-specific Vgamma2Vdelta2 T cells in nonhuman primates inoculated with Listeria monocytogenes DeltaactA prfA\**. *J Immunol*, 2012. **189**(3): p. 1285-93.
59. Ferrick, D.A., et al., *Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo*. *Nature*, 1995. **373**(6511): p. 255-7.
60. Kuhl, A.A., et al., *Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential*. *Immunology*, 2009. **128**(4): p. 580-8.
61. Wo, J., et al., *The Role of Gamma-Delta T Cells in Diseases of the Central Nervous System*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 580304.
62. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. *J Immunol*, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
63. Patil, R.S., et al., *IL17 producing gammadeltaT cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients*. *Int J Cancer*, 2016. **139**(4): p. 869-81.
64. Shiromizu, C.M. and C.C. Jancic, *gammadelta T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2389.
65. Wakita, D., et al., *Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(7): p. 1927-37.
66. Maimaitijiang, G., et al., *Association of Decreased Percentage of Vdelta2(+)Vgamma9(+) gammadelta T Cells With Disease Severity in Multiple Sclerosis*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 748.
67. Peters, C., et al., *TGF-beta enhances the cytotoxic activity of Vdelta2 T cells*. *Oncoimmunology*, 2019. **8**(1): p. e1522471.

68. Gong, G., et al., *Phosphoantigen-activated V gamma 2V delta 2 T cells antagonize IL-2-induced CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells in mycobacterial infection*. *Blood*, 2009. **113**(4): p. 837-45.
69. Caccamo, N., et al., *Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells*. *Blood*, 2011. **118**(1): p. 129-38.
70. Wesch, D., A. Glatzel, and D. Kabelitz, *Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype*. *Cell Immunol*, 2001. **212**(2): p. 110-7.
71. Schilbach, K., et al., *In the Absence of a TCR Signal IL-2/IL-12/18-Stimulated gammadelta T Cells Demonstrate Potent Anti-Tumoral Function Through Direct Killing and Senescence Induction in Cancer Cells*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(1).
72. Ribot, J.C., et al., *Human gammadelta thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling*. *J Immunol*, 2014. **192**(5): p. 2237-43.
73. Tomogane, M., et al., *Human Vgamma9Vdelta2 T cells exert anti-tumor activity independently of PD-L1 expression in tumor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021. **573**: p. 132-139.
74. Brandes, M., K. Willmann, and B. Moser, *Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells*. *Science*, 2005. **309**(5732): p. 264-8.
75. Harly, C., C.M. Peigne, and E. Scotet, *Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 657.
76. Rhodes, D.A., et al., *Regulation of Human gammadelta T Cells by BTN3A1 Protein Stability and ATP-Binding Cassette Transporters*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 662.
77. Hunter, W.N., *The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(30): p. 21573-7.
78. Eisenreich, W., et al., *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(12): p. 1401-26.
79. Hintz, M., et al., *Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 2001. **509**(2): p. 317-22.
80. Morita, C.T., et al., *Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vy2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens*. *Immunological Reviews*, 2007. **215**(1): p. 59-76.
81. Nguyen, K., et al., *The butyrophilin 3A1 intracellular domain undergoes a conformational change involving the juxtamembrane region*. *FASEB J*, 2017. **31**(11): p. 4697-4706.
82. Sebestyen, Z., et al., *RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by Vgamma9Vdelta2 T Cell Receptor*. *Cell Rep*, 2016. **15**(9): p. 1973-85.
83. Rigau, M., et al., *Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by gammadelta T cells*. *Science*, 2020. **367**(6478).
84. Schilbach, K., et al., *Suppressive activity of Vdelta2(+) gammadelta T cells on alphabeta T cells is licensed by TCR signaling and correlates*

- with signal strength.* Cancer Immunol Immunother, 2020. **69**(4): p. 593-610.
85. Gober, H.J., et al., *Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells.* J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 163-8.
  86. Aehnlich, P., et al., *Expansion With IL-15 Increases Cytotoxicity of Vgamma9Vdelta2 T Cells and Is Associated With Higher Levels of Cytotoxic Molecules and T-bet.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 1868.
  87. Meraviglia, S., et al., *In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients.* Clin Exp Immunol, 2010. **161**(2): p. 290-7.
  88. Dieli, F., et al., *Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer.* Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7450-7.
  89. Handgretinger, R. and K. Schilbach, *The potential role of gammadelta T cells after allogeneic HCT for leukemia.* Blood, 2018. **131**(10): p. 1063-1072.
  90. Skeen, M.J. and H.K. Ziegler, *Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12.* J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5832-41.
  91. Domae, E., et al., *Cytokine-mediated activation of human ex vivo-expanded Vgamma9Vdelta2 T cells.* Oncotarget, 2017. **8**(28): p. 45928-45942.
  92. Marx, S., D. Wesch, and D. Kabelitz, *Activation of human gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12.* J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2842-8.
  93. Carter, L., et al., *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2.* Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 634-43.
  94. Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe, *PD-1 and its ligands in T-cell immunity.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 309-14.
  95. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor.* Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
  96. Chen, L. and X. Han, *Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future.* J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3384-91.
  97. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.* J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
  98. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2018-28.
  99. Sabatier, R., et al., *Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer.* Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 5449-64.
  100. Thompson, R.H., et al., *Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17174-9.

101. Peters, C., et al., *Phenotype and regulation of immunosuppressive Vdelta2-expressing gammadelta T cells*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(10): p. 1943-60.
102. Zhao, Y., et al., *Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells*. Cell Rep, 2018. **24**(2): p. 379-390 e6.
103. Wrobel, P., et al., *Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 320-8.
104. Girardi, M., et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. Science, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
105. Kabelitz, D., et al., *Cancer immunotherapy with gammadelta T cells: many paths ahead of us*. Cell Mol Immunol, 2020. **17**(9): p. 925-939.
106. Miyashita, M., et al., *Strategies to Improve the Antitumor Effect of gammadelta T Cell Immunotherapy for Clinical Application*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(16).
107. Gentles, A.J., et al., *The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers*. Nat Med, 2015. **21**(8): p. 938-945.
108. Sugie, T., et al., *Combined effects of neoadjuvant letrozole and zoledronic acid on gammadelta T cells in postmenopausal women with early-stage breast cancer*. Breast, 2018. **38**: p. 114-119.
109. Wilhelm, M., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical gammadelta T cells*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 45.
110. Zhang, Z., et al., *"gammadelta T Cell-IL17A-Neutrophil" Axis Drives Immunosuppression and Confers Breast Cancer Resistance to High-Dose Anti-VEGFR2 Therapy*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 699478.
111. Sureshbabu, S.K., D. Chaukar, and S.V. Chiplunkar, *Hypoxia regulates the differentiation and anti-tumor effector functions of gammadelta T cells in oral cancer*. Clin Exp Immunol, 2020. **201**(1): p. 40-57.
112. Siegers, G.M., et al., *Functional Plasticity of Gamma Delta T Cells and Breast Tumor Targets in Hypoxia*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1367.
113. Traxlmayr, M.W., et al., *Immune suppression by gammadelta T-cells as a potential regulatory mechanism after cancer vaccination with IL-12 secreting dendritic cells*. J Immunother, 2010. **33**(1): p. 40-52.
114. Beatson, R.E., et al., *TGF-beta1 potentiates Vgamma9Vdelta2 T cell adoptive immunotherapy of cancer*. Cell Rep Med, 2021. **2**(12): p. 100473.
115. Capietto, A.H., et al., *Phosphoantigens overcome human TCRVgamma9+ gammadelta Cell immunosuppression by TGF-beta: relevance for cancer immunotherapy*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6680-7.
116. Rhodes, D.A., et al., *Activation of human gammadelta T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin*. J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2390-8.
117. Harly, C., et al., *Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset*. Blood, 2012. **120**(11): p. 2269-79.

118. Gu, S., et al., *Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (BTN3A1) and its implication on Vgamma9Vdelta2 T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(35): p. E7311-E7320.
119. Castella, B., et al., *The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and Vgamma9Vdelta2 T cell activation by dendritic cells*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15663.
120. Van Acker, H.H., et al., *Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells*. J Hematol Oncol, 2016. **9**(1): p. 101.
121. Yin, Z., et al., *Dominance of IL-12 over IL-4 in gamma delta T cell differentiation leads to default production of IFN-gamma: failure to down-regulate IL-12 receptor beta 2-chain expression*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3056-64.
122. Tsai, C.Y., et al., *Type I IFNs and IL-18 regulate the antiviral response of primary human gammadelta T cells against dendritic cells infected with Dengue virus*. J Immunol, 2015. **194**(8): p. 3890-900.
123. Tsuda, J., et al., *Involvement of CD56brightCD11c+ cells in IL-18-mediated expansion of human gammadelta T cells*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2003-12.
124. Sabbaghi, A., et al., *Role of gammadelta T cells in controlling viral infections with a focus on influenza virus: implications for designing novel therapeutic approaches*. Virol J, 2020. **17**(1): p. 174.
125. Li, W., et al., *Effect of IL-18 on expansion of gammadelta T cells stimulated by zoledronate and IL-2*. J Immunother, 2010. **33**(3): p. 287-96.
126. Jorgovanovic, D., et al., *Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review*. Biomark Res, 2020. **8**: p. 49.
127. Yang, R., et al., *Bispecific Antibody PD-L1 x CD3 Boosts the Anti-Tumor Potency of the Expanded Vgamma2Vdelta2 T Cells*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 654080.
128. Chen, D., et al., *Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 747324.
129. Michel, M.L., et al., *Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(43): p. 17549-54.
130. Hoeres, T., et al., *PD-1 signaling modulates interferon-gamma production by Gamma Delta (gammadelta) T-Cells in response to leukemia*. Oncoimmunology, 2019. **8**(3): p. 1550618.
131. Nada, M.H., et al., *PD-1 checkpoint blockade enhances adoptive immunotherapy by human Vgamma2Vdelta2 T cells against human prostate cancer*. Oncoimmunology, 2021. **10**(1): p. 1989789.
132. Iwasaki, M., et al., *Expression and function of PD-1 in human gammadelta T cells that recognize phosphoantigens*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 345-55.
133. Castella, B., et al., *Anergic bone marrow Vgamma9Vdelta2 T cells as early and long-lasting markers of PD-1-targetable microenvironment-*

- induced immune suppression in human myeloma. Oncoimmunology, 2015. 4(11): p. e1047580.*
134. Correia, D.V., et al., *Differentiation of human peripheral blood Vdelta 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. Blood, 2011. 118(4): p. 992-1001.*
  135. Peng, G., et al., *Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. Immunity, 2007. 27(2): p. 334-48.*

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin im Institut für Hämatologie und Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. Karin Schilbach durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Karin Schilbach.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Prof. Dr. Karin Schilbach und Dr. med. Hisayoshi Hashimoto von mir mit deren Unterstützung durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig mit Unterstützung durch Dr. med. Hisayoshi Hashimoto.

Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8 Veröffentlichungen

Die Arbeiten dieser Dissertationsschrift gehören zu den Vorarbeiten der Publikation

Suppressive activity of V $\delta$ 2+  $\gamma\delta$  T cells on  $\alpha\beta$  T cells is licensed by TCR signaling and correlates with signal strength. Schilbach, K., Krickeberg, N., Kaißer, C., Mingram, S., Kind, J., Siegers, G., Hashimoto, H., Cancer Immunol. Immunother. (2020). <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02469-8>

Die Ergebnisse meiner Dissertationsarbeit sind jedoch weder ganz, noch in Teilen Bestandteil dieser Veröffentlichung.

## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Karin Schilbach für das Überlassen des Themas und die Betreuung, sowie die Unterstützung bei der Durchsicht und der Umsetzung der Arbeit. Außerdem danke ich ihr für ihr entgegengebrachtes Vertrauen und das Ermöglichen dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Dr. med. Hisayoshi Hashimoto Danke sagen, der mir vor allem während meiner Zeit im Labor, aber auch darüber hinaus unterstützend und beratend als Betreuer und Freund zur Seite stand.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Geduld, die unermüdlichen Ermutigungen und den stetigen Zuspruch während der Zeit der Arbeit an dieser Dissertation