

Aus dem Institut für Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die Rolle von Butyrophilin 3A1 für die Präsentation  
von Phosphoantigenen für  $\gamma\delta$  T-Zellen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Patrik Theodor Nerdal**

aus Kiel

Kiel, 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Fred Fändrich

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.03.2018

Gez.: Prof. Dr. med. U. Kunzendorf  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

„kropla do kropli i będzie morze”  
Tropfen für Tropfen – und es wird Meer  
Polnisches Sprichwort

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. T-Zell Differenzierung im Thymus.....	1
1.2. $\alpha\beta$ T-Zellen.....	3
1.3. $\gamma\delta$ T-Zellen.....	5
1.4. Wechselwirkungen zwischen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen und umgebenden Leukozyten.....	7
1.5. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in der Tumorthherapie.....	9
1.6. Butyrophilin 3A1.....	10
1.7. Zielsetzung der Doktorarbeit.....	13
<b>2. Materialien</b> .....	<b>14</b>
2.1. Substanzen.....	14
2.2. Stimulantien und IL-2.....	16
2.3. Puffer und Lösungen.....	16
2.3.1. Für zellbiologische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen.....	17
2.3.2. Für biochemische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen.....	17
2.4. Geräte.....	20
2.5. Verbrauchsmaterialien.....	21
2.6. Software.....	22
2.7. Antikörper.....	22
2.7.1. Für Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.....	22
2.7.2. Für Imagestream verwendete Antikörper.....	23
2.7.3. Für Imagestream verwendete Färbungen.....	23
2.7.4. Für Immunpräzipitation, Westernblot und funktionelle Analysen verwendete Antikörper.....	23

2.8. Kits .....	24
2.9. Tumorzelllinien.....	24
2.10. Statistik.....	25
<b>3. Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1. Zell-basierte Methoden.....	25
3.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMZ).....	25
3.1.2. Isolierung von Leukozyten aus Vollblut.....	26
3.1.3. Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	26
3.1.4. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	26
3.2. Durchflusszytometrische Methoden.....	27
3.2.1. Oberflächenantikörpermarkierung.....	27
3.2.2. Oberflächenfärbung für adhärenente Tumorzellen.....	27
3.2.3. Oberflächenfärbung für Imagestream-Zytometrie.....	28
3.2.4. Zytotoxizitätsanalyse von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	29
3.2.4.1. Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Tumorzelllinien gegenüber $\gamma\delta$ T-Zellen.....	29
3.2.4.2. Modulation der $\gamma\delta$ T-Zell Antwort durch anti-BTN3A Antikörper.....	30
3.2.5. Analyse der $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation.....	31
3.2.5.1. Magnetische Isolation von Leukozytenpopulationen.....	32
3.2.5.2. SCDA (Standard Cell Dilution Assay).....	33
3.2.5.3. Herstellung von Standardzellen.....	34
3.3. Biochemische Methoden.....	35
3.3.1. Immunpräzipitation.....	35
3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.3.3. Western Blot.....	36

3.3.4. Proteinfärbung mittels Flamingo Pink (Bio Rad).....	37
3.3.5. Proteolytische Spaltung und Massenspektrometrie.....	37
3.3.6. Peptidmassenanalyse.....	38
3.3.7. Datenverarbeitung.....	39
3.3.8. BTN3A1-ELISA.....	39
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
4.1. Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch BTN3A-Antikörper.....	41
4.2. Die Rolle von antigenpräsentierenden Zellen.....	43
4.3. BTN3A-Oberflächenexpression.....	46
4.4. $\gamma\delta$ T-Zellreaktivität gegenüber Tumorzellen.....	50
4.5. BTN3A1-ELISA.....	52
4.6. BTN3A-interagierende Proteine.....	53
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>58</b>
5.1. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkennen Pyrophosphate.....	58
5.2. CD277 ist essentiell für die Erkennung von Pyrophosphaten.....	58
5.3. Expression von CD277.....	59
5.4. Monozyten können $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren, $CD4^+$ T-Zellen nach Zugabe löslicher Pyrophosphate oder von anti-BTN-Antikörpern.....	60
5.5. Die Tumorreaktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wird CD277-abhängig beeinflusst.	62
5.6. Einfluss von Zoledronat auf membranständige Expression von BTN3A.....	63
5.7. Verschiedene Proteine des Zytoskellets sind mögliche Interaktionspartner von BTN3A1 .....	65
5.8. Ausblick.....	68

<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>76</b>
<b>9. Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit.....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
BTN3A1	Butyrophilin3A1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	<i>Double negative</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>Double positive</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i>
FKS	Fetales Kälberserum
HLA	Human leukocyte antigen
HMBPP	4-hydroxy-but-2-enyl-Pyrophosphat
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IQGAP1	<i>Ras-GTPase activating like protein</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC	Major histocompatibility complex
MIC-A	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
MIC-B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>
n-BP	Aminobisphosphonat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rh	<i>recombinant human</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor</i>
TZR	T-Zell Rezeptor
WP	FACS-Waschpuffer



# 1. Einleitung

## 1.1. T-Zell Differenzierung im Thymus

T-Zellen entstehen aus Progenitorzellen des Knochenmarks oder der fötalen Leber, die sich im Thymus weiterentwickeln. Dem Thymus verdanken T-Zellen auch das „T“ in ihrer Namensbezeichnung (Davies et al. 1966). Die Vorläuferzellen im Thymus, die sich zu T-Zellen entwickeln sollen, werden auch als Thymozyten bezeichnet. Sie werden anhand des Signalmoleküls CD3 und der späteren Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 kategorisiert, die auf frühen Progenitorzellen allesamt noch nicht vorhanden sind. Daher werden Thymozyten in diesem Stadium als „Triple Negative“ (TN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>) oder „Double Negative“ Thymozyten (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) bezeichnet, je nachdem, ob CD3 als Marker zugerechnet wird. Ein T-Zell-Rezeptor (TZR) ist zum TN-Stadium ebenfalls noch nicht an der Oberfläche ausgebildet. Er entsteht durch somatische Rekombination verschiedener Keimbahn-Gene (V-[D]-J-Rekombination) (Anderson et al. 1996).

DN-Thymozyten durchlaufen wiederum verschiedene Reifungsstadien (DN1-4), die sich anhand der Ausbildung der Oberflächenmoleküle CD25 und CD44 unterscheiden lassen: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1), CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2), CD44<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup>(DN3) und CD44<sup>lo</sup>CD25<sup>-</sup>(DN4). Das Adhäsionsmolekül CD44 dient in den frühen Stadien vermutlich dazu, Vorläuferzellen vom Blutkreislauf in den Thymus zu bewegen (Wu et al. 1993). CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, ist erst ab dem DN2-Stadium an der Zelloberfläche vorhanden (Belizario et al. 2016). In den Stadien DN1-3 wird außerdem das Rezeptormolekül c-Kit exprimiert, ohne welches keine T-Zell-Reifung stattfindet (Waskow und Rodewald 2002).

Ein entscheidender Vorgang während der T-Zell Reifung im Thymus ist die Ausbildung des TZRs. Dabei handelt es sich um einen Protein-Heterodimer, bei dem entweder ein  $\alpha$ - mit einer  $\beta$ - oder eine  $\gamma$ - mit einer  $\delta$ -Kette kombiniert ist. Je nachdem, welcher TZR an der Zelloberfläche des Thymozyten ausgebildet wird ( $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$ ), unterscheiden sich auch die Reifungsvorgänge: Im Falle von  $\alpha\beta$  T-Zellen

wird zunächst die  $\beta$ -Kette hergestellt, während sich die  $\alpha$ -Kette erst im Folgestadium ausbildet. Entsteht jedoch eine  $\gamma\delta$ -T-Zelle, werden beide Ketten des Heterodimers im DN2-Stadium beginnend hergestellt. Die für einzelne TZR-Segmente kodierenden Genabschnitte werden dazu in bestimmter Weise rearrangiert und damit deutlich um DNA-Material reduziert bevor der fertige TZR an der Zelloberfläche erscheint (Hayday et al. 1999). Für die  $\alpha$ -Kette stehen etwa 44 V- (Variable)- Segmente und 61 J-(Verbindungs=“Joining“)-Segmenten (J) zur Verfügung, die zufällig miteinander verbunden werden. Im Falle der  $\beta$ -Kette sind es 64 V-, 14 J- und zusätzlich noch 2 D- ( Diversity )-Segmente (Toor et al. 2016). Im DN2 Stadium beginnt zunächst die DJ-Rekombination, im DN3-Stadium wird dann ein V- angefügt (Petrie et al. 1995, Tourigny et al. 1997). Thymozyten gehen nur dann in das DN4 über, wenn sich die  $\beta$ -Kette der TZRs erfolgreich ausgebildet hat. Anderenfalls verbleiben sie im DN3-Stadium. Im DN3 Stadium wird die neue  $\beta$ -Kette zur Zelloberfläche transportiert und verbindet sich mit einer vorläufigen  $\alpha$ -Kette zu einem sogenannten pre-TZR. Dieser pre-TZR bildet einen Komplex mit dem seit dem DN3-Stadium ausgebildeten CD3-Oberflächenmolekül und führt konsekutiv zu einer Proliferation der Thymozyten (von Boehmer et al. 1999, Borowski et al. 2002).  $\gamma\delta$  T-Zellen sind nicht auf die Bildung des pre-TZR angewiesen und können sich davon unabhängig entwickeln (Fehling et al. 1995).

Im Gegensatz zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen, die zumeist im DN-Stadium verbleiben und somit weder CD4 noch CD8 an der Zelloberfläche ausbilden, durchlaufen  $\alpha\beta$  T-Zellen im Folgenden ein doppelt positives (DP) Reifestadium, in dem beide Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Pereira et al. 2012). In diesem Stadium erscheint der reife TZR an der Zelloberfläche, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als bei ausdifferenzierten T-Zellen. Der weitere Reifungsprozess findet allerdings nur unter der Voraussetzung statt, dass die Thymozyten Peptide auf einem präsentierenden Molekül des *major histocompatibility complex* (MHC) erkennen (positive Selektion). Gleichzeitig wird entweder CD4 oder CD8 herunterreguliert, so dass die Thymozyten zu „einfach positiven“, d.h. entweder CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-,

Thymozyten differenziert werden. Im Rahmen der Reifung gehen alle Thymozyten zugrunde, deren TZR mit hoher Affinität gegen körpereigene Antigene gerichtet ist (negative Selektion) (Goldrath und Bevan 1999). Nur 2-5 % der eingewanderten Thymozyten werden als reife T-Zellen in die Peripherie entlassen.  $\gamma\delta$  T-Zellen können, da sie ihren TZR bereits gegen Ende des DN-Stadium ausgebildet haben, das DP-Reifestadium überspringen. Ob ein Thymozyt sich zu einer  $\alpha\beta$ - oder zu einer  $\gamma\delta$ -T-Zelle entwickelt, unterliegt vielen Regulationsmechanismen, beispielsweise der differentiellen Expression und Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase-„Erk“. Dieses Enzym unterdrückt die Ausbildung eines  $\alpha\beta$ - und fördert die Bildung des  $\gamma\delta$ -TZRs (Hayday et al. 1999). Auch andere TZR-unabhängige Signalwege können Einfluss auf die Differenzierung zu  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  T-Zellen nehmen (Kreslavsky et al. 2010).

## 1.2. $\alpha\beta$ T-Zellen

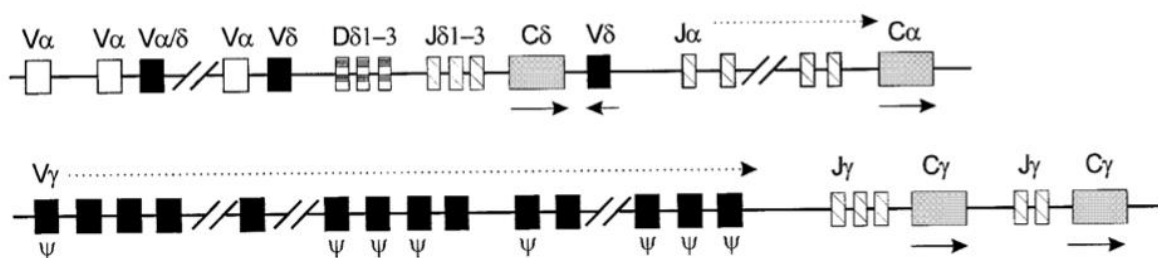
Die meisten reifen T-Zellen besitzen einen TZR, der sich aus einem  $\alpha\beta$ -Ketten-Heterodimer zusammensetzt. Durch die V(D)J-Rekombination, aber auch durch Ungenauigkeiten bei der Verbindung der DNA-Basen zwischen den V-, D- und J-Gensegmenten und Mutationen bei der anschließenden DNA-Replikation können theoretisch bis zu  $10^{18}$  verschiedene  $\alpha\beta$ -TZR erzeugt werden. T-Zellen mit  $\alpha\beta$ -TZR erkennen in aller Regel Antigene, die prozessiert und anschließend als Peptide auf MHC-(*major histocompatibility complex*)-Molekülen (beim Menschen auch HLA: *human leukocyte antigen*) von einer anderen Zelle präsentiert werden (Toor et al. 2016). Dieser Schritt kann bei jeder körpereigenen und kernhaltigen Zelle geschehen, wenn diese beispielsweise virusinfiziert ist oder entartet. Dann werden virale oder aus der Entartung entstandene mutierte Proteine von der Zelle auf einem MHC-I-Molekül präsentiert. Demgegenüber steht ein anderer Typ von MHC-Molekülen der Klasse II, die im Wesentlichen nur auf professionellen „Antigen-präsentierenden“ Zellen des Immunsystems wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert werden. Auf MHC-I-Molekülen werden endogene antigene Peptide für zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert, die dann wiederum die infizierten Zellen abtöten. Erreger, die von außen aufgenommen und in intrazellulären Vesikeln abgebaut werden, werden zu sogenannten exogenen

Peptiden prozessiert und über MHC-II-Moleküle dann CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T-Helferzellen) präsentiert. Ferner können auch Antigene von extrazellulären Erregern von B-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden, ebenso aktivieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen B-Zellen über Zytokine, wie beispielsweise IL-4. CD4<sup>+</sup> T-Zellen setzen in erster Linie Zytokine frei, die wiederum andere Immunzellen wie Makrophagen oder Granulozyten stimulieren (Murphy 2012).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in funktionelle Untergruppen einteilen. Die wichtigsten sind dabei T-Helferzellen Typ 1,2 oder 17 (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>), follikuläre T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>) und regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>). T<sub>H1</sub>-Zellen sind an der Abwehr von Viren oder Bakterien beteiligt. Sie entstehen vor allem durch den Einfluss des Zytokins IL-12. Sowohl Makrophagen und dendritische Zellen als Zellen der angeborenen Immunantwort produzieren diese Zytokine. Als Schlüsselenzym produzieren T<sub>H1</sub>-Zellen  $\gamma$ -Interferon (IFN $\gamma$ ), welches vor allem Makrophagen aktivieren kann. T<sub>H2</sub>-Zellen entstehen durch Einfluss des Zytokins IL-4 und Blockade vor allem von IL-12. Dabei aktivieren sie eosinophile sowie basophile Granulozyten und Mastzellen. Ferner sorgen sie dafür, dass B-Zellen Antikörper vom IgE-Typ produzieren. Das ist vor allem essentiell im Rahmen der Immunabwehr von Parasiten und Pilzen. T<sub>H2</sub>-Zellen produzieren als Schlüsselzytokin selber IL-4 (Murphy, Reiner 2002). T<sub>H17</sub>-Zellen sezernieren das proinflammatorische Zytokin IL-17, welches neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd anlocken kann. Sie entstehen, unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und gleichzeitigem Vorhandensein von IL-6. IL-6 wird von Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt, vor allem im Rahmen einer proinflammatorischen Reaktion bei bakteriellen oder viralen Infektionen. In Abwesenheit von IL-6 kann TGF- $\beta$  eine Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in induzierbare T<sub>reg</sub> bewirken (Belizario et al. 2016).

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

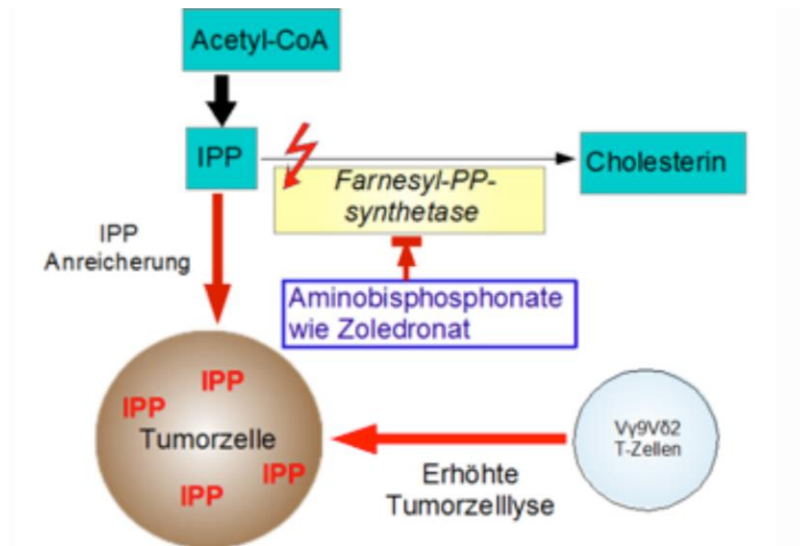
Etwa 1-5 % der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut exprimieren den alternativen  $\gamma\delta$ -TZR. Die V-Gene der  $\delta$ -Kette befinden sich vermischt zwischen den V-Genen der  $\alpha$ -Kette auf Chromosom 14 und vor. Anschließend folgen die den D- und die J-Genen der  $\delta$ -Kette. Insgesamt sind also die Gene für die  $\delta$ -Kette zwischen denen für die  $\alpha$ -Kette lokalisiert. Ferner können auch  $V\alpha$ -Segmente anstelle von  $V\delta$ -Genen in der  $\delta$ -Kette verwendet werden (Abbildung 1.1). Während im peripheren Lymphknoten das Verhältnis  $\gamma\delta$ : $\alpha\beta$  T-Zellen etwa 1:50 ist finden sich an Grenzflächen wie Haut oder Darmschleimhaut deutlich mehr  $\gamma\delta$  T-Zellen. So sind etwa 20 % der intraepithelialen T-Zellen der Darmschleimhaut  $\gamma\delta$  T-Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen stressinduzierte Antigene auf Epithelzellen ohne die Präsentation durch MHC-Moleküle erkennen können, was für die Immunabwehr an Grenzflächen im Sinne einer schnelleren Reaktion von Vorteil ist (Morita et al. 2001). Neben dem TZR exprimieren  $\gamma\delta$  T-Zellen auch Rezeptoren der angeborenen Immunität. Dazu gehört zum Beispiel der NKG2D-Rezeptor (*Natural Killer Group 2 Member D*), der auch auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gefunden wird.



**Abbildung 1.1.:** Die V-Gene für der  $\delta$ -Kette finden sich zwischen denen für  $\alpha$ -Kette. Die  $V\gamma$ -Gene werden durch Pseudogene – hier mit  $\psi$  unter dem schwarzen Kasten gekennzeichnet - interkaliert, denen keine Bedeutung bei der Bildung des  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptorproteins zukommt (aus Hayday et al. 2000).

NKG2D erkennt Membranproteine, die auf körpereigenen Zellen durch Stress – wie Hitze oder DNS-Schädigung - induziert bzw. hochreguliert werden, beispielsweise MIC-A (*MHC class I polypeptide-related sequence A*), MIC-B und ULBP1-6 (*UL16 binding protein 1-6*). Diese Moleküle werden oft zum Teil konstitutiv auf Tumorzellen exprimiert, so dass  $\gamma\delta$  T-Zellen derartige Tumorzellen erkennen können. (Chiplunkar et al. 2009, Kabelitz et al. 2013).

Im Unterschied zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen gibt es nur wenige (6) exprimierte  $V\gamma$ - und  $V\delta$ -Gene. Allerdings ist die Expression bestimmter  $V\gamma/V\delta$  Kombinationen stark reguliert. Man unterscheidet prinzipiell zwischen  $V\delta 2$  T-Zellen, die fast immer ein Heterodimer mit der  $V\gamma 9$  Kette bilden und  $\gamma\delta$  T-Zellen, mit anderen variablen  $\delta$  Ketten. Die letzteren werden entsprechend als *non-V $\delta 2$*  T-Zellen bezeichnet.  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen bilden bei Erwachsenen die Mehrheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen im peripheren Blut.  $V\delta 1$  T-Zellen finden sich vor allem in Haut und in der Darmschleimhaut (Kabelitz et al. 2005, Kabelitz et al. 2013). Im Unterschied zu  $\alpha\beta$  T-Zellen erkennen  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen nicht MHC-präsentierte Peptide, sondern kleine phosphorylierte Moleküle, Pyrophosphate oder „Phosphoantigene“ z.B. aus dem Cholesterolsyntheseweg. Derartige Intermediate fallen in eukaryoten Zellen und somit beim Menschen im Mevalonatweg und bei Parasiten und Prokaryoten im Methylerythriolweg gebildet an. Das 4-hydroxy-but-2-enyl-Pyrophosphat (HMBPP) ist ein Beispiel für ein mikrobielles und somit aus menschlicher Sicht körperfremdes Pyrophosphat. Ein wichtiger endogener Ligand für  $\gamma\delta$  T-Zellen ist Isopentenylpyrophosphat (IPP), ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese. In Tumorzellen wird IPP infolge des dysregulierten Mevalonat-Stoffwechsels oft überproduziert. Interessanterweise kann die endogene Produktion von Pyrophosphaten wie IPP pharmakologisch beeinflusst werden. Aminobisphosphonate (n-BPs) wie Zoledronat werden aufgrund ihrer Wirkung auf die Knochenresorption zur Therapie der Osteoporose und von Knochenmetastasen bei Krebserkrankungen eingesetzt (Gober et al. 2003). Darüber hinaus stimulieren n-BPs über eine Hemmung des IPP-weiterverarbeitenden Enzyms Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) auch die  $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivierung. Diese Inhibition führt zu einer intrazellulären IPP-Anreicherung und in der Folge zur  $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivierung (Abbildung 1.2) (Roelofs et al. 2009, Thompson et al. 2010).



**Abbildung 1.2: Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Aminobisphosphonate.** In Tumorzellen wird oft aufgrund eines dysregulierten Mevalonat-Stoffwechsels vermehrt IPP produziert, das von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen erkannt wird. Wird die weitere Verstoffwechslung zu Cholesterin über die Farnesylpyrophosphat-Synthase pharmakologisch durch n-BPs gehemmt, kommt es zu einer Anreicherung des IPPs in Tumorzellen und zu einer Stimulation von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen.

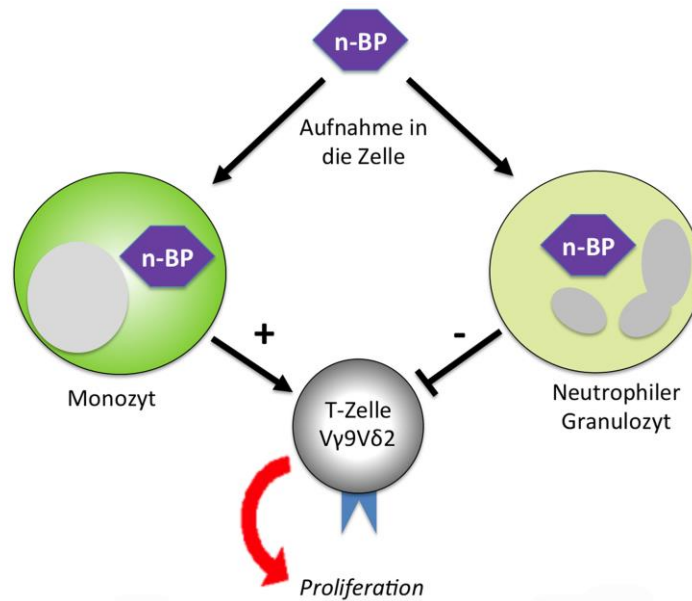
#### 1.4. Wechselwirkungen zwischen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen und umgebenden Leukozyten

Obwohl  $\gamma\delta$  T-Zellen HLA-unabhängig durch tumorassoziierte Pyrophosphate aktiviert werden, sind sie nicht unabhängig von Wechselwirkungen mit umgebenden Leukozyten. Dies zeigt sich besonders, wenn  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen *ex vivo* stimuliert werden: Aus mononukleären Zellen – einem Zellgemisch aus Lymphozyten und Monozyten - werden  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen selektiv durch Inkubation mit n-BPs aktiviert. Dabei nehmen Monozyten die n-BPs über Endozytose auf, die dann die Produktion von IPP induzieren und damit  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen stimulieren (Roelofs et al. 2009). Für  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellklone konnte gezeigt werden, dass sie zwar in Abwesenheit anderer Leukozyten, nicht aber ohne Zellkontakt untereinander auf Pyrophosphate reagieren können (Morita et al. 1995). Beide Reaktionen der  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen auf Pyrophosphate zeigen, dass nicht nur der Kontakt zwischen  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen und Tumorzellen entscheidend ist, sondern auch das Zusammenspiel mit umgebenden Leukozyten.

Im Blut stellen neutrophile Granulozyten bis zu 75 % der Leukozyten dar (Chistiakov et al. 2015). Die Interaktion zwischen Granulozyten und  $\gamma\delta$  T-Zellen hängt vom Antigen ab: Werden lösliche Pyrophosphate zugegeben, verstärkt die Anwesenheit neutrophiler Granulozyten in Zellkultur die  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-Expansion und Aktivität. Interessanterweise können aber neutrophile Granulozyten die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach intrazellulärer Aufnahme von n-BPs hemmen, wobei auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen eine Rolle spielt. So könnte auch die beobachtete Abnahme peripherer  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen nach langer Therapie mit intravenösen n-BPs durch die inhibitorische Aktivität neutrophiler Granulozyten erklärt werden (Kalyan et al. 2014).

Insgesamt ist die Wirkung von exogenen Pyrophosphaten und der endogenen Pyrophosphatanreicherung durch n-BPs auf andere Immunzellen noch nicht völlig verstanden. Für die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen durch lösliche Pyrophosphate wie das HMBPP ist ein direkter Zellkontakt erforderlich. Bei der Stimulation durch n-BPs können verschiedene Zelltypen unterschiedliche Effekte ausüben:  $CD14^+$ -Monozyten stimulieren bei Zugabe von n-BPs die Expansion von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen (Chandrasekaran et al. 2015), während neutrophile Granulozyten die  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-Proliferation (vor allem durch die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite) abschwächen (Abbildung 1.3) (Kalyan et al. 2014).





**Abbildung 1.3: Die Effekte von Aminobisphosphonaten (n-BP) auf Leukozyten in der Umgebung von  $\gamma\delta$  T-Zellen:** Monozyten und neutrophile Granulozyten nehmen n-BPs auf. Während Monozyten dadurch die Proliferation von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen fördern, reduzieren neutrophile Granulozyten deren Expansion.

## 1.5. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in der Tumorthherapie

$\gamma\delta$  T-Zellen haben in der Regel starke zytotoxische Aktivität und können eine Vielzahl unterschiedlicher Tumore HLA-unabhängig abtöten. Es besteht daher großes Interesse daran,  $\gamma\delta$  T-Zellen für die Tumorthherapie einzusetzen und erste Studien wurden bereits durchgeführt (Hannani et al. 2012). Dabei ist vor allem die Reaktion auf Pyrophosphate aus zwei Gründen vielversprechend:

1.  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen lassen sich durch Pyrophosphate HLA-unabhängig *ex vivo* expandieren und im autologen Therapieansatz einsetzen (Nussbaumer et al. 2013).
2. Die tumorzeleigene Zielstruktur IPP lässt sich durch Gabe von Aminobisphosphonaten zusätzlich anreichern (Chiplunkar et al. 2009).

Klinische Studien zeigten dabei, dass *ex vivo*-expandierte  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen eine vielversprechende Option bei der Therapie von soliden und hämatologischen Malignomen darstellen (Kobayashi et al. 2011, Abe et al. 2009, Dieli et al. 2007). Um

allerdings diese Therapieform gezielter weiterzuentwickeln, ist ein deutlich umfassenderes Verständnis über die Mechanismen der  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-vermittelten Tumorzelllyse erforderlich. Bisher kann man zusammenfassen, dass die Zugabe von n-BPs zu mononukleären Blutzellen zum intrazellulären IPP-Anstieg in Monozyten und damit zur selektiven Proliferation und zur Aktivierung des zytotoxischen Potentials von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen führt. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, wie der Anstieg des intrazellulären IPPs in Monozyten die Reaktivität der  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen auslöst. Ebenso ist noch nicht völlig verstanden, wie die direkte  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-Stimulation durch lösliche Pyrophosphate (z.B. HMBPP) mechanistisch abläuft, da sie prinzipiell auch ohne direkten Zellkontakt stattfinden kann (Morita et al. 1995, Roelofs et al. 2009a). In diesem Kontext wurde erst kürzlich berichtet, dass für die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl durch endogene Pyrophosphate nach n-BP-Gabe, als auch durch exogene Pyrophosphate das ubiquitär exprimierte Membranmolekül Butyrophilin 3A1 (BTN3A1) unerlässlich ist (Harly et al. 2012, Sandstrom et al. 2014, Vavassori et al. 2013).

## 1.6. Butyrophillin 3A1

Die Butyrophiline bilden eine Gruppe von B7-verwandten Proteinen, deren Gene auf dem Chromosom 6 lokalisiert sind und für Typ I Transmembranproteine kodieren. Sie gehören zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und tragen zwei extrazelluläre Domänen. Zurzeit sind drei Butyrophiline in der 3A-Gruppe bekannt, die kollektiv auch als CD277 bezeichnet werden. BTN3A1 ist an der Vermittlung und Regulation der T-Zellantwort durch Pyrophosphate beteiligt (Harly et al. 2012, Rhodes et al. 2015). Es besitzt eine intrazelluläre B30.2 Domäne mit der charakteristischen „*tripartite*“ Aminosäuresequenz „PRYSRY“. Die Funktion dieser Domäne ist noch weitgehend unverstanden, es gibt jedoch Hinweise, dass sie Eigenschaften einer Ubiquitin E3 Ligase hat und an der Regulation der angeborenen Immunantwort bei Infektionen beteiligt ist (D'Cruz et al. 2013). Neben BTN3A1 gibt es zwei weitere Moleküle der Butyrophilin 3A-Gruppe, die für die  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-Aktivierung jedoch eine eher untergeordnete Rolle spielen: Butyrophilin 3A2 und Butyrophilin 3A3. Beide

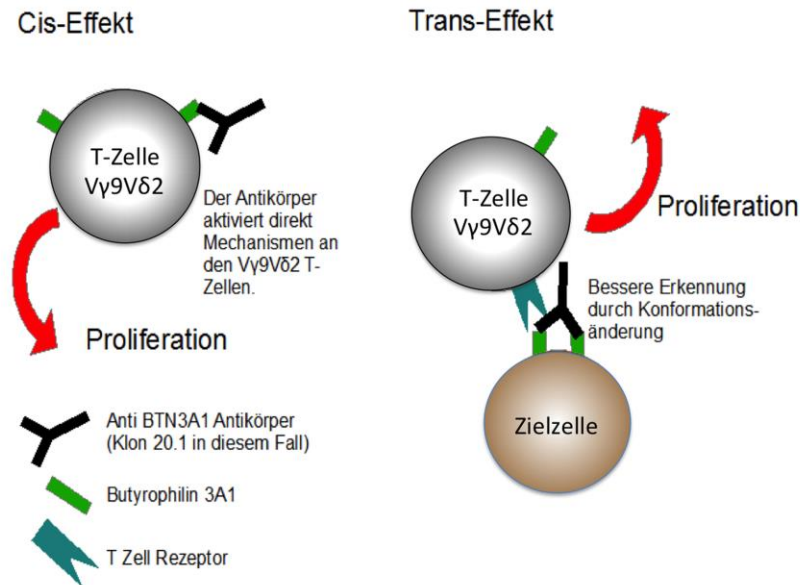
enthalten ebenfalls die Immunglobulinähnlichen extrazellulären Domänen. Die intrazelluläre Domäne fehlt allerdings bei BTN3A2 komplett und ist beim BTN3A3 durch eine 70 Aminosäuren lange Kette verlängert (Vavassori et al. 2013, Harly et al. 2012).

Über den Mechanismus, wie V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen durch Phosphoantigene zur Proliferation angeregt werden, gibt es zur Zeit widersprüchliche Befunde. Interessanterweise ist BTN3A1 sowohl für das lösliche bakterielle HMBPP und das eukaryotischen IPP als auch für die Reaktion auf die gesteigerte endogene IPP-Produktion durch n-BP Gabe notwendig. Für beide Reaktionstypen ist nicht nur BTN3A1 erforderlich, sondern möglicherweise auch andere Moleküle, die auf dem Chromosom 6 lokalisiert sind (Riaño et al. 2014). Dies lässt vermuten, dass die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zell-Aktivierung komplex reguliert ist.

Es gibt ebenfalls widersprüchliche Befunde zu der Frage, ob die Pyrophosphate extrazellulär an BTN3A1 binden und so dem  $\gamma\delta$ -TZR „präsentiert“ werden (Vavassouri et al. 2013), primär über die intrazelluläre B30.2-Domäne wirken (Sandstrom et al. 2014; Rhodes et al. 2015) oder ob ggf. die verschiedenen Pyrophosphat-Typen unterschiedliche Signalwege benötigen. In Hinblick auf die Bindung der Pyrophosphate an die extra- bzw. intrazelluläre Domäne gibt es ebenfalls unterschiedliche Befunde: *Vavassouri et al.* konnten in ihren Experimenten mittels Massenspektrometrie und Biacore-Studien zeigen, dass Pyrophosphate an den extrazellulären Bereich von BTN3A1 binden können, während *Sandstrom et al.* keine extrazelluläre Bindung nachweisen konnten. Vielmehr konnten diese Autoren eine Bindung des IPP an die intrazelluläre B30.2 Domäne nachweisen (Vavassori et al. 2013, Sandstrom et al. 2014). Zumindest für die endogene Stimulation durch n-BP ist ein Mechanismus unter Einbeziehung einer intrazellulären Bindung und einer konsekutiven BTN3A1-abhängigen Veränderung an der äußeren Zellmembran vorstellbar. Dafür spricht sowohl, dass eine Stimulation mit n-BP die Membranfluidität von BTN3A1 beeinflusst (Harly et al. 2012), als auch, dass Mutationen der B30.2-Domäne zu einem Abbruch der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zell-Aktivität führt, nicht aber Veränderungen der extrazellulären Abschnitte (Wang und Morita, 2015).

Interessanterweise kann die  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-Aktivität auch direkt durch Antikörper gegen BTN3A beeinflusst werden. Dabei zeigen zwei Antikörperklone unterschiedliche Wirkung. Der Klon 20.1 (Compte et al. 2004, Messal et al. 2011) führt bei *in vitro*-Zugabe ähnlich wie Phosphoantigen zu einer Expansion von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen aus mononukleären Blutzellen und steigert außerdem deren Aktivität gegen Tumorzellen (Harly et al. 2012). Lösliche Pyrophosphate oder n-BP sind dazu nicht erforderlich. Der Antikörperklon 103.2 (Harly et al. 2012) hingegen wirkt neutralisierend und hebt die Aktivität von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen nach Pyrophosphate-Gabe auf. Beide Antikörper sind allerdings nicht spezifisch für BTN3A1. Sie sind kreuzreaktiv mit den Isoformen BTN3A2 und BTN3A3. Interessanterweise kann der Antikörperklon 20.1 seine Wirkung auch über BTN3A2 oder BTN3A3 auslösen. Dazu ist außer dem BTN3 Oberflächenmolekül kein weiteres Protein des Chromosoms 6 erforderlich (Harly et al. 2012, Riaño et al. 2014).

Ungeklärt bleibt der Mechanismus, wie anti-BTN3A Antikörper die  $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivierung beeinflussen. Möglich wäre, dass die Antikörper an BTN3A auf  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen binden und dort eine Signalkaskade in Bewegung setzen, also ein sogenannter „Cis-Effekt“ stattfindet. Genauso könnte aber auch eine Bindung an BTN3A einer Nachbarzelle verantwortlich sein. Dies kann eine benachbarte  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zelle, eine Tumorzelle oder eine andere Immunzelle sein, die dann nach Antikörperbindung und dadurch induzierter Konformationsänderung zu einer Erkennung durch  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen führt. Diese Art der Reaktion bezeichnet man als „Trans-Effekt“ (Abbildung 1.3) (Harly et al. 2012).



**Abbildung 1.3.:** Zwei Theorien zum Wirkmechanismus der anti-BTN3A Antikörper am Beispiel des aktivierenden Antikörperklons 20.1. Cis-Effekt: Der Antikörper bindet BTN3A-Moleküle der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen, was zu einer direkten Aktivierung führt. Trans-Effekt: Der Antikörper verändert die Konformation von BTN3A an der Zielzelle durch direkte Bindung. Dies wird von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen erkannt.

## 1.7. Zielsetzung der Doktorarbeit

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen können nach vorheriger Aktivierung Krebszellen abtöten und sind deshalb interessant für die zellbasierte Tumorthherapie. Bisher ist jedoch ihr Aktivierungsmechanismus nur unvollständig verstanden. Das Transmembranprotein Butyrophilin 3A1 und erhöhte cytoplasmatische Spiegel von Lipid-assoziierten Pyrophosphaten in Zielzellen können V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen aktivieren. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt. Vor der Nutzung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen für die Krebstherapie muss jedoch der Aktivierungsmechanismus genau abgeklärt werden um eine maximale Schädigung der Krebszellen unter Aussparung gesunder Zellen zu ermöglichen.

In diesem Zusammenhang sollte die vorliegende Arbeit folgende Fragen beantworten:

1. Welche Tumoren eignen sich für eine Immuntherapie durch V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen?
2. Welche Rolle spielen unterschiedliche Leukozyten in der Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen durch Pyrophosphate oder n-BP?
3. Welche Bindungsproteine sind an der Butyrophilin 3A1-abhängigen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zell-Stimulation beteiligt?
4. Werden die extrazellulären Bereiche von Butyrophilin durch Pyrophosphatexposition verändert?

## 2. Materialien

Verwendete Abkürzungen: APS = Ammoniumperoxodisulfat (Ammoniumpersulfat); BSA = Rinderserumalbumin; DMSO = Dimethylsulfoxid; EDTA = Ethylendiamintetraacetat; FKS = Fetales Kälberserum; IPP = Isopentenylpyrophosphat; n-BP = Aminobisphosphonat; PFA = Paraformaldehyd; PI = Propidiumjodid; PMBC = periphere mononukleäre Blutzellen; PMSF = Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid; rh = rekombinant, human; rcf = *relative centrifugal force*; relative Zentrifugationsbeschleunigung; TEMED = Tetramethylethylendiamin; WP = FACS-Waschpuffer.

### 2.1. Substanzen

Name	Bezugsquelle
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Protein Untersuchungsreagenz	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem, Darmstadt
ECL Plus	GE Healthcare, München

Eosin	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Karlsruhe
Ficoll-Hypaque (1,077 g/mL)	Biochrom, Berlin
Flamingo Fluorescent gel stain	Bio Rad
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Frema Granovita, Heimertingen
Monensin	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaF	Merck, Darmstadt
NaN <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorourid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumorthovanadat	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma, Taufkirchen
Nitrozellulosemembran	Machery Nagel, Düren
Nonident P-40 (NP-40)	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen
Phosphat Gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Protein-marker	Biorad, München
RPMI 1640-Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Temed	Serva, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka, Buchs, Schweiz
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vollständiger Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	Roth, Karlsruhe

$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure (CHCA)	Laser Labs, Sophia-Antipolis Cedex, Frankreich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

## 2.2. Stimulantien und IL-2

Name	Finale Konzentration	Bezugsquelle
BrHPP (Bromohydrinpyrophosphat)	300 nM	Innate Pharma, Marseille (Frankreich)
HMBPP ((E)-4-Hydroxy-3-methyl- but-2-enyl pyrophosphat)	1 nM	Echelon Biosciences, Salt Lake City (USA)
Zoledronat	5 $\mu$ M	Novartis, Basel (Schweiz)
Lovastatin	5 $\mu$ M	Sigma, Taufkirchen
rIL-2	50 IU/mL (1:200 Verdünnung)	Novartis, Basel (Schweiz)

## 2.3. Puffer und Lösungen

Medien/Puffer	Bezugsquelle
Ficoll® Hypaque Lösung (1,077 g/mL)	Biochrom AG
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies
RPMI1640	Life Technologies



### 2.3.1. Für zellbiologische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Substanz	Endkonzentration
Einfriermedium (EFM)	RPMI - 1640	
	FKS	20 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)
Eosinlösung	Eosin	0,2 % (w/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,05 % (w/v)
	NaCl	0,9 % (w/v)
	FKS	10 % (v/v)
FACS-Waschpuffer (WP)	PBS	
	BSA	1 % (v/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,1 % (w/v)
MACS-Waschpuffer (MP)	PBS	
	BSA	0,5 % (w/v)
	EDTA	2 mM
Paraformaldehydlösung	PBS	
	PFA	0,1 % (v/v)
Standardzell-Puffer (StdZP)	WP	
	Standardzellen	0,1*10 <sup>6</sup> Zellen/mL
	PI	0,2 µg/mL

### 2.3.2. Für biochemische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Substanz	Endkonzentration
Elektrophoresepuffer (Bio Rad, 10x)	ddH <sub>2</sub> O	
	Tris	3,03 % (w/v)
	Glycin	14,4 % (w/v)
	SDS	1 % (w/v)
Elektrophoresepuffer (NuPAGE)	ddH <sub>2</sub> O	
	NuPAGE™ MES-Puffer	5 % (v/v)

Laufgel (Bio Rad, 10%ig)	ddH <sub>2</sub> O 30 %ig Acrylamid/Bisacrylamid Tris-Puffer 1M, pH 8,8 10 %ig SDS 20 %ig APS TEMED	28,7 % (v/v) 33 % (v/v) 36 % (v/v) 1 % (v/v) 0,33 % (v/v) 0,066 % (v/v)
NP-40 Lysepuffer	NP-40 Tris (pH 7,4) NaCl EDTA Natriumorthovanadat Natriumflourid Natriumpyrophosphat PMSF Aprotinin Leupeptin Pepstatin	1 % (v/v) 20 mM 150 mM 5 mM 1 mM 10 mM 1 M 1 mM 2 µg/mL 2 µg/mL 2 µg/mL
Probenpuffer (Bio Rad)	SDS Glycerin Tris-Puffer 1M, pH 6,8 Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	6 % (w/v) 30 % (v/v) 200 mM 0,005 % (v/v) 2-5 % (v/v)
Sammelgel (Bio Rad)	ddH <sub>2</sub> O 30 %ig Acrylamid/Bisacrylamid Tris-Puffer 1 M, pH 6,8 10 %ig SDS 20 %ig APS TEMED	69,5 % (v/v) 16,5 % (v/v) 12,4 % (v/v) 1 % (v/v) 0,49 % (v/v) 0,1 % (v/v)
Tris buffered saline (TBS)	ddH <sub>2</sub> O Tris NaCl pH 7,5-8,0	10 mM 150 mM
Tris buffered saline-Tween (TBS-T)	TBS Tween 20	0,05 % (v/v)
Western-Blot-Transferpuffer	ddH <sub>2</sub> O Tris Glycin Methanol 10 %ig SDS	25 mM 192 mM 20 % (v/v) 1 % (v/v)
Modifizierter RIPA-Lysepuffer	ddH <sub>2</sub> O	

	NP-40 Tris-HCl pH 7,5 NaCl Triton X-100 EDTA Na-desoxycholat	1 % (v/v) 0,05 M 0,15 M 1 % (v/v) 1 mM 0,25 % (w/v)
RIPA-Lysepuffer	ddH <sub>2</sub> O EDTA Tris pH 7,4 Triton X-100 Na-desoxycholat SDS	150 mM 1 M 1 % (v/v) 1 % (w/v) 0,1 % (w/v)
Flamingo Pink Fixierlösung	ddH <sub>2</sub> O Ethanol Essigsäure	40 % (v/v) 10 % (v/v)
Flamingo Pink Entfärbelösung	ddH <sub>2</sub> O Tween20	0,1 % (w/v)
10x Ammoniumbicarbonat	Ammoniumbicarbonat Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	250 mM 192 mM
Trifluoressigsäure (TFA) 0,1 %	TFA Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	0,1 % (v/v)
Matrixlösung	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA) TFA Acetonitril	3,2 mg 650 $\mu$ L 350 $\mu$ L
25 mM Ammoniumbicarbonat + Acetonitril 1:1	Ammoniumbicarbonat 250 mM Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade) Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	5 mL 45 mL 50 mL

## 2.4. Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absaugvorrichtung	Filter Mate Harvester	Perkin Elmer
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heracell 240i	Heraceus
Durchflusszytometer	FACS Calibur™	BD Biosciences
Durchflusszytometer	ImageStream®	Merck Millipore
Entwicklermaschine		Agfa, Gera
Multistepper	Nichiryo 8100	Nichiryo, USA
Kühlzentrifuge	Biofuge 15R	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Megafuge 16/16R	Thermo Scientific
Mehrkanalpipette 3-300 µL	Finnpipette	Thermo Scientific
Mikroplatten-Photometer	Infinite™ M200	Tecan
Neubauer-Zählkammer		Fischer
Netzgerät	Power Supply 250-2	Sigma
Netzgerät	Power Pack 200/300	Bio Rad
Pipettierhilfen (10, 100, 200, 1000 µL)		Eppendorf
Elektrophoresekammer	Protean® II xi Cell	Bio Rad
Sterilbank	Lamin air™	Thermo Scientific
Thermomixer compact	Thermostat 5320	Eppendorf
Vortex-Gerät	REAX 2000	Heidolph Reax
Western Blot Transfer-Kammer	Trans-blot®	Bio Rad
Zentrifuge	Biofuge 15R	Heraceus
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraceus
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraceus

## 2.5. Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
ECL-Chemolumineszenz-Film	Hyperfilm™	Amersham
Einfrierröhrchen	CryoTube™	Thermo Scientific
FACS-Röhrchen (0,6 mL)	Round base test Tube	Sterilin
FACS-Röhrchen (5 mL)		BD Biosciences
Filterpapier		Whatman
MACS-LS-Säulen		Miltenyi Biotec
Mikrotitrierplatte	Maxisorb	Nunc
Nitrozellulose-Membran	Hybond™ C Extra	Amersham
Parafilm	Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten gestopft		Hecht
Pasteurpipetten ungestopft		Hecht
Pipetierhilfe	Accu-jet™ pro	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen		Sarstedt
Protein A-Sepharose™ 4B		Invitrogen
Protein G-Sepharose™ 4B		Invitrogen
PS-Abdeckplatten	127,0/85/11MM, Standard	Greiner
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)		Sarstedt
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 mL)		Greiner
Steppertips 0,06 mL		Süd Laborbedarf
Steppertips 0,6 mL		Süd Laborbedarf
Transwell Einsatz	Cell Culture Insert/ Anopore, 8 Well (0,2 µm Porengröße)	Nunc
Zellkulturflaschen (50, 250, 650 mL)		Greiner
Zellkulturplatte, Rundboden, 96 Kavitäten	MicroWell™	Thermo Scientific

Zellkulturplatte, Stitzboden, 96 Kavitäten		Nerbe plus
Zellkulturplatten, Flachboden, (6, 12, 24, 96 Kavitäten)	MicroWell™	Greiner
Zentrifugenrandröhrchen (15 mL und 50 mL, ohne Stehrand)		Greiner

## 2.6. Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro™	BD Biosciences
Microsoft Office 2016™	Microsoft
FlowJo™	FlowJo

## 2.7. Antikörper

Für Antikörper, deren Konzentration unbekannt war, wurde die verwendete Verdünnung angegeben.

Verwendete Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; FITC = Flouresceinisothiocyanat; PE = Phycoerythrin; HRP = Meerrettichperoxidase. (*horseadish peroxidase*)

### 2.7.1. Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Einsatzkonzentration	Bezugsquelle
BTN3A	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	20.1	500 µg/mL oder 50 µg/mL	BioLegend
CD107a	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	H4A3	pur	BD Biosciences
CD107a	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	H4A3	50 µg/mL	BioLegend
TZRYδ	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	11F7	25 µg/mL	BD Biosciences
CD3	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	SK7	20 µg/mL	BD Biosciences
CD3	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	SK7	6,25 µg/mL	BD Biosciences
CD4	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	SK3	0,6 µg/mL	BD Biosciences
CD14	PE	Maus IgG <sub>2b</sub> , κ	MφP9	5 µg/mL	BD Biosciences
CD14	FITC	Maus IgG <sub>2b</sub> , κ	MφP9	5 µg/mL	BD Biosciences

CD66b	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	04	0,1 mg/mL	Sino Biological Inc.
CD3	APC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	SK7	10 µg/mL	BD Biosciences
V <sub>γ</sub> 9	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	7A5	25 µg/mL	Aus eigener Herstellung (Kabelitz et al. 1990)
Kontrolle	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	X40	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	X40	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	APC	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	X40	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Maus IgG <sub>2b</sub> , κ	20116	entsprechend	R&D Systems

### 2.7.2. Für Imagestream verwendete Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Einsatzkonzentration	Bezugsquelle
BTN3A	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	20.1	10 µg/mL	BioLegend
Maus IgG	Alexa 488	Esel IgG	polyklonal	10 µg/mL	Invitrogen

### 2.7.3. Für Imagestream verwendete Färbungen

Zielstruktur	Bezeichnung	Bezugsquelle
Zellmembran	CellMask <sup>TM</sup> deep red plasma membrane stain	Life Technologies
Zellmembran	Wheat Germ Agglutinin	Life Technologies
Zellkern	Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate	Life Technologies

### 2.7.4. Für Immunpräzipitation, *Westernblot* und funktionelle Analysen verwendete Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Einsatzkonzentration	Bezugsquelle
BTN3A	unkonjugiert	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	20.1	1 µg/mL	BioLegend
Maus light chain	HRP	Ziege IgG	polyklonal	0,1 µg/mL	Millipore
BTN3A	unkonjugiert	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	103.2	5 µg/mL	Daniel Olive, Toulouse, Frankreich
BTN3A1	unkonjugiert	Hase IgG	polyklonal	0,35 mg/ml	Abcam

## 2.8. Kits

Kit	Bezugsquelle	KatalogNr.
Anti-TCR $\gamma\delta$ Microbead Kit	Miltenyi Biotec	130-092-892
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec	130-091-155
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec	130-059-901
Human CD4 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit	Miltenyi Biotec	130-096-533
CD14 <sup>+</sup> Microbeads	Miltenyi Biotec	130-050-201
Human Neutrophil Enrichment Kit	Stemcell™ technologies	19257
Human butyrophilin subfamily 3 member A1 (BTN3A1) ELISA Kit	CusaBio	CSB-EL002873HU

## 2.9. Tumorzelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Kalthoff (Institut für experimentelle Tumorforschung, Christian Albrechts Universität, Kiel) zur Verfügung gestellt oder kommerziell erworben. Verwendete Abkürzungen: ATCC = *American Type Culture Collection*; AML = Akute Myeloische Leukämie; DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; ECACC = *European Collection of Cell Cultures* (Salisbury, UK); PDAC = Pankreatisches duktales Adenokarzinom.

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Bezugsquelle
Colo357	Pancreas, Primärtumor	PDAC	Holger Kalthoff
PancTu1	Pancreas, Primärtumor	PDAC	Holger Kalthoff
Panc89	Pancreas, Lymphknotenmetastase	PDAC	Holger Kalthoff
THP1	Monozytenleukämie	AML	ATCC



Daudi	B-Zellymphom	Burkittlymphom	ATCC und DSMZ
Raji	B-Zellymphom	Burkittlymphom	DSMZ
MCF7	Brust, Primärtumor	Duktales Adenokarzinom	ATCC
A172	Gehirn, Primärtumor	Glioblastom	ECACC
T98G	Gehirn, Primärtumor	Glioblastom	ECACC
U251MG	Gehirn, Primärtumor	Glioblastom	ECACC
U87	Gehirn, Primärtumor	Glioblastom	ECACC
MDA-MB-231	Brust, Pleurametastase	Adenokarzinom	ATCC
PC-3	Prostata, Knochenmetastase	Adenokarzinom	ATCC

## 2.10 Statistik

Für die in Experimenten aufgeführten Statistiken wurde Microsoft Excel 2016 verwendet und ein zweiseitiger, gepaarter t-test angewandt.

## 3. Methoden

### 3.1. Zell-basierte Methoden

#### 3.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMZ)

Zur Isolierung der mononukleären Zellen aus Vollblut wurde ausgenutzt, dass intakte mononukleäre Zellen eine andere Dichte aufweisen, als die übrigen zellulären Blutbestandteile. Dazu wurde Blut mit PBS verdünnt und davon 30 – 35 mL auf 15 mL Ficoll (Dichte = 1,077 g/mL) überschichtet und zentrifugiert (693 rcf, 20 Minuten, ohne Bremse). Dichtere zelluläre Bestandteile wie Erythrozyten oder Granulozyten pelletieren; Monozyten und Lymphozyten sedimentieren als „Interphasering“ an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma/PBS. Thrombozyten bleiben mit dem Überständigen Plasma in Suspension. Der Interphasering wurde abgetragen und im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt. Es schlossen sich 3 Waschschrte mit PBS an: Zuerst bei 444 rcf, 5 Minuten, anschließend 2mal 174 rcf, 10 Minuten. Die Waschschrte dienen der Entfernung übergebliebenen Ficolls und Thrombozyten.

Das Pellet wird dann in 50 mL RPMI-Medium mit 10 % FKS aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Leukozytenkonzentrate gesunder Spender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt. Ein Votum der zuständigen Ethikkommission zur Verwendung der Leukozytenkonzentrate lag vor (D405I10).

### 3.1.2. Isolierung von Leukozyten aus Vollblut

Zur Isolierung aller Leukozytenpopulationen aus peripherem Blut ist die ficollbasierte Aufbereitung der mononukleären Blutzellen nicht ausreichend: Zellpopulationen wie Granulozyten werden mit ihr aussortiert. Sollen diese in Experimente mit einbezogen werden, ist ein anderes Verfahren erforderlich, in welchem Erythrozyten und Thrombozyten lysiert und so von den restlichen Leukozyten abgetrennt werden.

Dazu wurde gesunden Spendern eine zweckmäßige Menge peripheres Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und bei 444 rcf 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und in 10 mL Vollblut-Waschpuffer resuspendiert und zentrifugiert. Im Verhältnis 1:6 zum Volumen der pelletierten Zellen wurde Lysepuffer zugegeben und 12 Minuten unter Lichtausschluss bei gelegentlicher Agitation bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und der Niederschlag 2-mal in Vollblut-Waschpuffer gewaschen und anschließend in dem gleichen Puffer aufgenommen.

### 3.1.3. Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen

Zur selektiven Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden zuvor isolierte PMBZ mit dem Aminobisphosphonat „Zoledronat“ stimuliert. Dazu wurden 10 Millionen PMBZ in 5 mL RPMI Medium mit 10 % FKS mit 5  $\mu$ M Zoledronat und IL-2 inkubiert. Über 14-28 Tage wurde alle 2 bis 3 Tage IL-2 zugegeben.

### 3.1.4. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zu Bestimmung der Zellzahl werden 25  $\mu$ l einer zweckmäßig vorverdünnten

Zellsuspension mit 75 µl Eosinlösung vermengt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl vitaler und toter Zellen bestimmt. Der Farbstoff Eosin durchdringt dabei nur abgestorbene Zellen und markiert diese rot.

## 3.2. Durchflusszytometrische Methoden

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) lassen sich Zellen anhand verschiedener Parameter charakterisieren: Im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht werden die Größe und die Granularität von Zellpopulationen bestimmt. Zellpopulationen, die sich nicht anhand der physikalischen Lichtbrechungseigenschaften unterscheiden lassen, können weitestgehend anhand von extra- oder auch intrazellulären „Markern“ differenziert werden. Dazu wurden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper verwendet. Bei dem in diesen Experimenten verwendeten Durchflusszytometer können bis zu 4 verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig unterschieden werden.

### 3.2.1. Oberflächenantikörpermarkierung

Zur Markierung von Oberflächenproteinen wurden 100.000 bis 500.000 Zellen in einer 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte bei 207 rcf, 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und 2 mal in WP gewaschen. Nach Abtragen des Überstandes wurden auf die in den Kavitäten verbliebenen Zellen 7-10 µl Antikörperlösung gegeben und für 30 Minuten bei 4°C (oder auf Eis) inkubiert. Die Waschschrte wurden wiederholt und die Zellen in 60-100 µl 1 % Paraformaldehydlösung (PFA) aufgenommen.

### 3.2.2. Oberflächenfärbung für adhärenente Tumorzellen

Die verwendeten adhärenenten Tumorzelllinien wurden über Nacht in eine 6-Kavitäten-Platte zu je 400.000 Zellen/mL in 3 mL Nährmedium mit oder ohne 100 µM Zoledronat inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit einem Zellschaber

mechanisch oder für 10-20 Minuten bei 37 °C in Trypsinlösung gelöst. Anschließend folgte eine Oberflächenfärbung nach bereits beschriebenen Schema (Kap. 3.2.1).

### 3.2.3. Oberflächenmarkierung für Imagestream®-Zytometrie

Für die Imagestream®-Zytometrie wurden die zu untersuchenden Zellen ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Im Gegensatz zur konventionellen Durchflusszytometrie wird nicht nur die Fluoreszenzintensität bestimmt, sondern auch ein epifokales Bild von jeder Zelle gemacht. Dabei lassen sich auch Lokalisationen der gesuchten Strukturen sowie Daten großer Zellmengen ermitteln und miteinander vergleichen. Dazu werden die zu analysierenden Zellen aufbereitet und verschiedene Oberflächenstrukturen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Da bei jedem Fluoreszenzfarbstoff auch Emissionen in anderen optischen Kanälen stattfinden, werden zusätzlich zu den zu messenden Proben auch Kontrollen angefertigt, in denen ausschließlich einer der Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommt. Daraus wird dann berechnet welchen Anteil diese Färbung an der gemessenen Fluoreszenz in den anderen Kanälen hat und das spätere Bild entsprechend korrigiert. Untersucht wird dabei, welche Auswirkungen unterschiedliche intrazelluläre IPP-Konzentrationen auf die Oberflächenlokalisierung von BTN3A haben.

Alle Färbeschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach jedem Schritt folgten 2 Waschschrte in 500 µl PBS bei 137 rcf für 5 Minuten. Zunächst wurden 1 – 2 Millionen Zellen in 100 µl 4 % Formaldehydlösung aufgenommen und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen dann in 100 µl Permeabilisierungslösung 20 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl anti-BTN3A Antikörperklon 20.1 (Endkonzentration 10 µg/mL) und anschließend der Sekundärantikörper zugegeben und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nicht permeabilisierte Zellen wurden in 100 µl PBS mit Membranfarbstoff (CellMask™ oder WGA; 1:1000) für 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dann in einem zweckmäßigen Volumen 4 % PFA Lösung, die einen Zellkernfarbstoff enthält

(Hoechst; 1:10000), aufgenommen.

### 3.2.4. Zytotoxizitätsanalyse von $\gamma\delta$ T-Zellen

Um unter verschiedenen Bedingungen die Zytotoxizität von  $\gamma\delta$  T-Zellen auf Tumorzellen zu analysieren, wurden  $\gamma\delta$  T-Zell-Kurzzeitlinien mit einer Reinheit von mindestens 85% mit Tumorzellen kultiviert.  $\gamma\delta$  T-Zellen lysieren Tumorzellen unter anderem durch die Freisetzung zytotoxischer Granula. Dabei fusionieren Lysosomen mit der Zellmembran, um so zytotoxische Substanzen freizusetzen. Als Nebeneffekt der Fusion kommt das lysosomale Protein LAMP1 (CD107a) an die Zelloberfläche und wird dort nachweisbar. So können Tumorzellysen unter verschiedenen Versuchsbedingungen verglichen werden.

#### 3.2.4.1. Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Tumorzelllinien gegenüber $\gamma\delta$ T-Zellen

In diesem Experiment wurde die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber verschiedener Tumorzellen unter verschiedenen BTN3A1 aktivierenden Bedingungen verglichen.

Dazu wurden zunächst 96-Kavitäten-Flachbodenplatten für adhärente Tumorzelllinien oder 96-Kavitäten-Rundbodenplatten für Suspensionszellen mit je 20.000 Tumorzellen in 100  $\mu$ l RPMI Medium pro Kavität versehen. Für solide Tumorzelllinien erfolgte nach sechs Stunden Adhäsionszeit ein Mediumwechsel. Die einzelnen Kavitäten wurden dann unterschiedlich supplementiert:

1. Unbehandelte Tumorzellen
2. Für 20 Stunden mit 20  $\mu$ M Zoledronat
3. Für 2 Stunden mit 20  $\mu$ M Zoledronat
4. Für 20 Stunden mit 300 nM BrHPP

5. Für 2 Stunden mit 300 nM BrHPP
6. Für 20 Stunden mit dem anti-BTN3A (5 µg/mL) Antikörperklon 20.1
7. Für 2 Stunden mit dem anti-BTN3A (5 µg/mL) Antikörperklon 20.1
8. Unstimulierte Tumorzellen für die Isotypkontrolle

Anschließend wurden 250.000  $\gamma\delta$  T-Zellen in 50 µl hinzugegeben sowie 10 µl anti-CD107a-Antikörper (FITC konjugiert, 50 µg/mL). Die 96-Kavitäten-Platten wurden dann eine Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Monensinlösung (3 µM Endkonzentration pro Kavität) zugegeben. Es folgte eine Inkubation über 3 Stunden und danach wurden die Zellsuspensionen in den 96-Kavitäten-Platten abgetragen und von einer 96-Kavitäten-Rund- in eine 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte übertragen. Die Zellen wurden mit einem anti-TZR- $\gamma\delta$  Antikörper (25 µg/mL PE konjugiert, Klon 11F7) gefärbt. Es folgte eine durchflusszytometrische Analyse: Dabei wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen (im PE-Kanal angefärbt) auf ihre LAMP1-Oberflächenexpression (im FITC Kanal angefärbt) analysiert und verglichen.

### 3.2.4.2 Modulation der $\gamma\delta$ T-Zell Antwort durch anti-BTN3A Antikörper

In einer 6-well-Platte wurden 400.000 monozytäre THP1-Tumorzellen in 1,5 mL Nährmedium unter folgenden Bedingungen bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> vorinkubiert:

1. Ohne Stimulation
2. Über 20 Stunden mit 20 µM Zoledronat
3. Über 2 Stunden mit 20 µM Zoledronat

Die unstimulierten Tumorzellen wurden abzentrifugiert (137 rcf, 5 Minuten) und in einem mL Nährmedium aufgenommen und in 3 Gruppen bei 37 °C inkubiert:

1. Ohne Stimulation 90 Minuten.
2. Koinkubation mit dem anti-BTN3A Antikörperklon 20.1 (5 µg/mL)
3. Koinkubation mit dem anti-BTN3A Antikörperklon 103.2 (5 µg/mL)

Die Tumorzellen wurden anschließend in PBS gewaschen (2 Durchgänge, 137 rcf, 5 Minuten), in einem zweckmäßigen Volumen Medium (RPMI + 10 % FKS) aufgenommen und nach Ermittlung der Zellzahl auf eine Tumorzellkonzentration von 200.000 Zellen/mL verdünnt. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurden auf Kavitäten

einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte verteilt, 250.000 Zellen aus einer  $\gamma\delta$ -T-Zell-Kultur in 50  $\mu$ l Nährmedium hinzugegeben sowie 10  $\mu$ l anti-CD107a (FITC gelabelt, 50  $\mu$ g/mL) und folgendermaßen inkubiert:

1. Unbehandelte Tumorzellen
2. Unbehandelte Tumorzellen für die Isotypkontrolle
3. Tumorzellen nach 20 Stunden Vorinkubation mit Zoledronat
4. Tumorzellen nach 20 Stunden Vorinkubation mit Zoledronat und Koinkubation mit dem anti-BTN3A Antikörperklon 103.2
5. Tumorzellen nach 90 Minuten Vorinkubation mit Zoledronat
6. Tumorzellen nach 90 Minuten Vorinkubation mit dem anti-BTN3A Antikörperklon 20.1
7. Tumorzellen nach 90 Minuten Vorinkubation mit dem anti-BTN3A Antikörperklon 103.2 und Koinkubation mit BrHPP (300 nM)
8. Unbehandelte Tumorzellen in Koinkubation mit BrHPP (300 nM)
9. Nährmedium ohne Tumorzellen
10. Nährmedium ohne Tumorzellen in Koinkubation mit BrHPP (300 nM)

Nach einer Stunde Inkubation wurden 10  $\mu$ l Monensinlösung (auf eine Endkonzentration in der Kavität von 3  $\mu$ M) zugegeben. Die Zellen wurden mit dem anti-TZR-V $\gamma$ 9 7A5 gefärbt. Es folgte eine durchflusszytometrische Analyse: Dabei wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen anhand ihrer LAMP1-Oberflächenbindung verglichen.

### 3.2.5. Analyse der $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation

Es wurde weiterhin analysiert, welche Auswirkungen Leukozyten-Subpopulationen als Antigen-präsentierende Zellen auf die  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation haben. Hierfür wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen über magnetische Trennsäulen aus PBMZ isoliert. Die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen (je 8.000 - 10.000) wurden gemeinsam mit isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD14<sup>+</sup>-Monozyten oder neutrophilen Granulozyten (je 25.000, 50.000 oder 100.000) und gegebenenfalls einem  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimulus (HMBPP, anti-BTN3A-Antikörperklon 20.1, Zoledronat) 7 Tage in Kulturmedium (RPMI mit 10 % FKS und mit Zusatz von IL-2 und z.T. IL-18) inkubiert. Es folgte eine Bestimmung der Gesamtzellzahl der V $\gamma$ 9 T-Zellen, da die verwendeten Stimuli ausschließlich V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen aktivieren.

### 3.2.5.1. Magnetische Isolation von Leukozytenpopulationen

Um selektiv Zelltypen zu isolieren und für weitere Experimente zu verwenden ist die sogenannte magnetaktivierte Zellsortierung (MACS) eine vielfach eingesetzte Möglichkeit. Dabei werden in einem Zellgemisch Oberflächenstrukturen, mit biotinylierten Antikörpern gebunden und anschließend mit Microbeads, an denen gegen Biotin gerichtete Antikörper gebunden sind, vermengt. Das Gemisch wird über magnetische Säulen gegeben, in denen die magnetischen *beads* und mit ihnen die markierten Strukturen zurückbleiben. Dabei können nun Oberflächenmoleküle einer bestimmten Unterpopulation markiert, magnetisch in der Säule festgehalten und anschließend aus der Säule herausgespült werden, indem das Magnetfeld entfernt wird (positive Isolation). Ferner können aber auch alle vorkommenden Zellpopulationen bis auf die gesuchte markiert und in der magnetischen Säule festgehalten werden. Die gesuchte Zellpopulation ist somit in dem Zellgemisch, das durch die Säule hindurch geht und deren Zellen nicht durch das zugegebene Antikörpergemisch gebunden worden sind (negative Isolation). Die negative Isolation hat den Vorteil, dass die isolierten Zellen keine Antikörper an der Zelloberfläche gebunden haben (Miltenyi et al. 1990).

In den folgenden Experimenten wurden zur Isolation von  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $CD4^+$  T-Zellen negative Isolationen, für Monozyten ( $CD14^+$ ) ein positives Isolierungsprotokoll verwendet.

Die Isolierungen wurden stets auf Eis mit vorgekühlten Reagenzien durchgeführt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Zunächst wurden PBMZ isoliert. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (300 g, 10 Minuten) und in MACS-Puffer aufgenommen. Die Volumina für Puffer und Reagenzien wurden jeweils nach Zellzahl und Herstellerangaben bestimmt. Anschließend wurde das Biotin-Antikörper-Gemisch hinzugefügt und 5-10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann in MACS-Puffer gewaschen, resuspendiert und mit anschließend mit anti-Biotin Microbeads vermengt. Diese Suspension wurde dann für 10-15 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend gewaschen. Die Suspension wurde über eine magnetische Säule gegeben. Die Säulen wurden anschließend mehrmals mit MACS-Puffer gewaschen und der gesamte Durchfluss zentrifugiert in Medium



aufgenommen und für weitere Experimente verwendet. Im Falle einer positiven Isolierung wurden die Säulen anschließend aus dem Magnetfeld entfernt und gespült, alle zurückgebliebenen und magnetisch markierten Strukturen wurden zurückgehalten.

Das Protokoll für die Isolierung neutrophiler Granulozyten weicht vom dem der anderen Zellpopulationen ab. Hier handelt es sich ebenfalls um eine negative Isolierung, die allerdings nicht mit einer magnetischen Säule, sondern mit einem stationären Magneten stattfindet. Da neutrophile Granulozyten nicht zu den PMBZ gehören wurde zunächst humanes Blut nach dem Protokoll der Isolierung von peripheren Blutzellen aus Vollblut verwendet. Die Blutzellen wurden gezählt und nach Herstellerangaben auf die gewünschte Konzentration gebracht. Ein Gemisch aus Antikörpern gegen alle Leukozytenpopulationen bis auf neutrophile Granulozyten (Negativisolation) wurde je nach Zellmenge zugegeben und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Partikel hinzugegeben und wieder für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit MACS-Puffer verdünnt, das Gefäß zu dem stationären Magneten gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben. Dieser Schritt wurde mit dem neuen Gefäß wiederholt und es blieb eine Suspension angereicherter neutrophiler Granulozyten.

### 3.2.5.2. SCDA (Standard Cell Dilution Assay)

Die Methode des SCDA wurde verwendet, um in einem heterogenen Zellgemisch mittels Durchflusszytometrie absolute Zellzahlen einer gewünschten Population zu ermitteln. Dabei können Zellen nach ihrer Größe und ihrer Granularität im Vorwärts- oder Seitwärtsstreulicht untersucht werden, aber auch mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert und so anhand von Oberflächenmarkern unterschieden werden. Zum Ausschluss toter Zellen wird Propidiumjodid (PI) verwendet. Diese DNA-interkalierende Substanz kann durch die geschädigte Membran toter Zellen diffundieren und markiert diese so mit einer deutlichen Fluoreszenz. Zu dem zu analysierenden Zellgemisch wird eine definierte Menge Standardzellen gegeben.

Standardzellen sind CD4-positive Suspensionszellen mit einer einheitlichen sehr stark fluoreszierenden Oberflächenmarkierung, die sich von den anderen verwendeten Markierungen unterscheidet (in diesem Fall APC als Fluorochrom). Die Anzahl untersuchter Zellen korreliert mit der Anzahl der in der Messung erhaltenen Standardzellen. Da die Anzahl der zugegebenen Standardzellen bekannt ist, lässt sich so die absolute Zellzahl ermitteln (Pechhold *et al.* 1994).

Dazu wurde in zuvor angesetzten 96-Kavitäten-Rundbodenplatten das Zellgemisch resuspendiert und auf eine 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte übertragen. Im Anschluss wurde die Rundbodenplatte mit PBS gespült, um auch verbliebene Zellen auf die Spitzbodenplatte zu übertragen. Diese wurde dann bei 300 rcf, 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und das Pellet ohne einen weiteren Waschschrift in 20 µl *FcR-Blocking* Lösung aufgenommen, zusätzlich je 5 µl Fluorochromgekoppelter Antikörper zugegeben (5 µl anti-Vγ9-FITC, Klon 7A5 und 5 µl anti-CD3-PE, Klon SK7) und 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift in Waschpuffer (300g, 8 Minuten, 4 °C) folgten keine weiteren Waschschriffe um Zellverluste auf ein Minimum zu reduzieren. Das Pellet wurde in 100 µl Standardzellpuffer (StdZP) aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.2.5.3. Herstellung von Standardzellen

Unter der Verwendung eines Negativisolationskit der Firma Miltenyi Biotec wurden CD4 T-Zellen gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Zur Generation eines starken Fluoreszenzsignals wurden die Zellen zunächst mit einem Gemisch aus verschiedensten Biotin gekoppelten monoklonalen Antikörpern bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert (Gesamtvolumen: 200 µl/100x10<sup>6</sup> Zellen. Verwendet wurden anti-MHC I mAk (Klon W6/32, 50 µg/mL), anti-TZR(pan)αβ mAk (Klon BMA031, 50 µg/mL), anti-CD2 mAk (Klon OKT11, 30 µg/mL), anti-CD3 mAk (Klon OKT3, 50 µg/mL) und anti-CD4 mAk (Klon OKT4.5, 20 µg/mL).

Nach einem Waschschrift wurden (5 mL WP, 300 rcf) die Zellen mit einem Biotin-gekoppelten Ziege- anti-Maus-Antikörper für 20 Minuten bei 4 °C markiert (100

$\mu\text{l}/100 \times 10^6$  Zellen). Nach 2 weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit APC-markierten Streptavidin inkubiert (45 Minuten, 4 °C, 50  $\mu\text{L}/100 \times 10^6$  Zellen). Nach einem weiteren Waschschrtritt wurden die Zellen in 10 mL 1 %iger PFA-Lösung über Nacht fixiert. Die Zellen wurden nach einem anschließenden Waschschrtritt in WP resuspendiert auf eine Gesamtkonzentration von  $10^7$  Zellen/mL. Diese Zellsuspension konnte 6 Monate verwendet werden. In den Experimenten wurde die Suspension mit Waschpuffer verdünnt und mit einer Endkonzentration von  $10^5$  Zellen/mL verwendet.

### 3.3. Biochemische Methoden

#### 3.3.1. Immunpräzipitation

Mittels (Ko-)Immunpräzipitation sollten mögliche Bindungspartner von BTN3A1 identifiziert werden.

Zur Immunpräzipitation wurden THP1-Zellen verwendet, von denen aus Vorexperimenten bekannt war, dass sie insbesondere nach Vorbehandlung mit Zoledronat effizient von  $\gamma\delta$  T-Zellen lysiert werden. Je 200 Millionen Zellen wurden über Nacht in Nährmedium ohne Zusatz oder mit 20  $\mu\text{M}$  Zoledronat vorbehandelt. Am Folgetag wurden die Zellen zunächst zweimal in 50 mL PBS gewaschen und daraufhin jeweils in 4 mL Lysepuffer (NP-40 oder modRIPA) resuspendiert, homogenisiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Je 1 mL aus allen Proben wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und bei 10.000 g, 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit Protein G- bzw. Protein A-gekoppelten Sepharosebeads bei 4 °C für eine Stunde rotiert. Dabei sollten Proteine entfernt werden, die unspezifisch an die Sepharosebeads binden. Nach Zentrifugation wurden die Sepharosebeads als Kontrollen aufgehoben und die Überstände wurden mit je 2  $\mu\text{g}$  anti-BTN3A Antikörper (Klon 20.1) und 2  $\mu\text{g}$  eines polyklonalen anti-BTN3A1 Antikörpers (Ab115947) sowie Protein G und/oder Protein A Sepharosebeads für eine Stunde bei 4 °C rotiert. Die Sepharosebeads wurden

abzentrifugiert, drei- bis fünfmal mit Lysepuffer gewaschen, in 50 µl Probenpuffer aufgenommen und über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### 3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proben werden in einem Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Probenpuffer vorbehandelt. Dabei reduziert  $\beta$ -Mercaptoethanol Disulfidbrücken, während Dodecylsulfat mit dem Dodecylrest an die hydrophoben Bereiche des Proteins (wasserunlösliche Areale) bindet und durch die Sulfatreste dem Protein Wasserlöslichkeit und eine negative Ladung verleiht. Somit sind alle enthaltenen Proteine negativ geladen und lassen sich durch Gleichstrom in Bewegung setzen und nach der molekularen Masse auftrennen..

Bei dem hier verwendeten „Protean-II-System“ wurden die Gele selbst angefertigt. Dabei wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit 96 %igem Ethanol überschichtet, um so eine möglichst glatte Oberfläche zu erzeugen. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Proben wurden mit der Hälfte des Endvolumens an Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die aufgekochten Präzipitate wurden in die Geltaschen transferiert und anschließend mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 – 70 V über Nacht.

### 3.3.3. Western Blot

Mittels *Western Blot* lassen sich in einem über SDS-Elektrophorese aufgetrennten Proteingemisch spezifische Proteine über Enzym-gekoppelte Antikörper nachweisen. Dabei werden die im Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der mithilfe der spezifischen Antikörper individuelle Zielproteine markiert werden können. Dabei wird die Membran gemeinsam mit dem Gel in einer Transferkammer unter Strom gesetzt (0,8 A, 2 Stunden bei 4°C). In die Transfer-

Kassette werden von der Anode bis zur Kathode folgender Komponenten eingepresst: Schwamm, 2 Whatman-Papiere, Gel, Nitrozellulosemembran, 2 Whatman-Papiere, Schwamm. Nach dem Transfer wurde die Membran mit demineralisiertem Wasser gespült und es folgte eine Färbung mit Ponceau S, um die Transfereffizienz zu überprüfen. Die reversible Proteinfärbung wurde durch Inkubation mit TBST entfernt, bevor die Membran für eine Stunde in 5 % BSA blockiert wurde. Darauf folgend wurde der Primärantikörper – in diesem Fall der anti-BTN3A Antikörper 20.1 – in TBST zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde ausgewaschen (dreimal für 10 Minuten in TBST) und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für 45 Minuten zugegeben. Nach 3 weiteren 10-minütigen Waschschritten mit TBST konnten die spezifisch markierten Proteine mithilfe des ECL-Detektionsreagenz und anschließender Belichtung mit Hyperfilm-ECL Filmen dargestellt werden.

#### 3.3.4. Proteinfärbung mittels Flamingo Pink (Bio Rad)

Da mittels *Western Blot* in der Regel nur bekannte Proteine oder Proteine mit bestimmten Modifikationen nachgewiesen werden können, ist diese Methode zur Identifizierung möglicher BTN3A1-Bindungsproteine nicht geeignet. Entsprechende Präzipitate wurden daher in der Regel parallel zum *Western Blot* über ein weiteres Gel aufgetrennt und anschließend einer sensitiven Proteinfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flamingo-Pink unterzogen, um sie für eine massenspektrometrische Identifizierung weiter verarbeiten zu können. Dazu wurden die Gele zunächst über mindestens 3 Stunden fixiert (Flamingo Pink Fixierlösung) und danach mindestens 14 Stunden in der entsprechenden Färbelösung inkubiert. Es folgten 2 Waschschriffe für je 10 Minuten mit  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Die Gele wurden anschließend im Fluoreszenzscanner vermessen (Anregung 532 nm, Detektion 610 nm).

#### 3.3.5. Proteolytische Spaltung und Massenspektrometrie

Bei der Vorbereitung der Proben zur Massenspektrometrie wurden umfangreiche Schutzmaßnahmen getroffen, um Kontaminationen mit Fremdproteinen (wie z.B.

Keratin) zu vermeiden. Interessant erscheinende Banden wurden markiert und mittels automatischem Picker oder Handpicker wurden individuelle Spots ausgestanzt. Die Gelspots wurden je mit 70  $\mu\text{l}$   $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  dreimal für mindestens 20 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben mit 100  $\mu\text{l}$  50 mM Ammoniumbicarbonat in 50 % Methanol umgepuffert. Dabei wurden die Proben gleichzeitig dehydriert, was schließlich mit 100  $\mu\text{l}$  70 % Acetonitril vollständig erfolgte. Die vollständig dehydrierten Gelspots (erkennbar an einer Weißfärbung) konnten in diesem Zustand bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  für bis zu 3 Monate gelagert werden oder direkt mit Trypsin verdaut werden. Dazu wurden die Spots zunächst mit 100 ng Trypsin in 10  $\mu\text{l}$  25 mM Ammoniumbicarbonat bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  für 10 Minuten rehydriert. Die gequollenen Proben wurden dann nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  25 mM Ammoniumbicarbonat bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht verdaut. Die im Gel verdauten Proben wurden nun eluiert mit 20  $\mu\text{l}$  0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in ACN unterstützt von einer 15-minütigen Ultraschallbehandlung. Der Überstand wurde in eine 96-Kavitäten U-Bodenplatte überführt. Es folgte eine Dehydrierung der Gelspots mit 20  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA in ACN. Dies wurde so lange zugegeben bis durch eine Weißfärbung zu erkennen war, dass die Gele vollständig dehydriert waren. Der dort gewonnene Überstand wurde mit dem bereits abgenommenen vermengt. Um die eluierten Peptide einzuengen, wurden die Proben auf mittlerer Heizstufe für 30 Minuten im Vakuum zentrifugiert. Die Proben wurden nach Aufnahme in 0,8  $\mu\text{l}$  Matrixlösung auf eine MALDI-Edelstrahlplatte mit 192-Kavitäten pipettiert und luftgetrocknet.

### 3.3.6. Peptidmassenanalyse

Die Peptidmassenanalyse wurde mit dem MALDI-TOF/TOF 5800 Proteomics Analyzer Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) im Labor von Herrn

Prof. Dr. Andreas Tholey (Abteilung Systematische Proteomik und Bioanalytik, Institut für Experimentelle Medizin, CAU Kiel) durchgeführt. Die Spots wurden für die Analyse mit 1000-2000 Laserimpulsen beschossen und die gemessenen Spektren kumuliert. Die Fragmente des Trypsins, die aus der Autolyse entstanden sind, dienten zur internen Kalibrierung der Spektren und wurden aus der Datenbanksuche ausgeschlossen.

### 3.3.7. Datenverarbeitung

Für die Datenbanksuche der Peptidmassen nach passenden Proteinen wurde die Software „GPS Explorer Version 3.6“ (Applied Biosystems) angewandt. Die ermittelten Daten wurden an den MASCOT-Server Version 2.2.04 (Matrix Science Ltd., London, UK) übermittelt und mit allen Proteinen des *homo sapiens* aus einer „in-house“ Datenbank verglichen. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet: Die Carboxyamido-methylierung an Cysteinen wurde als obligatorisch vorausgesetzt. Die Oxidation von Methionin oder Deamidation von Asparagin wurde als potentielle Modifikation eingestuft. Die maximale Anzahl an fehlenden tryptischen Spaltungen war auf 1 gesetzt und monoisotopische Massen zugelassen. Die Massentoleranz wurde  $\pm 30$  ppm gesetzt. Mit einem Konfidenzintervall von 95 % wurden Proteine als sicher identifiziert.

### 3.3.8. BTN3A1-ELISA

In einem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) lassen sich Konzentrationen festgelegter Zielmoleküle in Lösung bestimmen. Dabei wird das zu untersuchende Reagenz, zum Beispiel Zellkulturmedium, zu mit Antikörper vorbeschichtete Kavitätenplatten gegeben, inkubiert und gewaschen, so dass das zu untersuchende Molekül an den Antikörpern gebunden ist. Im nächsten Schritt wird ein weiterer, aber nicht identischer, für die Zielstruktur spezifischer Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt wird, zugegeben. Durch Zugabe eines Enzymsubstrats spiegelt sich die Enzymaktivität durch eine Einfärbung der Kavitäten wieder: Diese ist proportional zur

Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Reagenzes. Die Tatsache, dass 2 unterschiedliche Antikörper eingesetzt werden und ein positives Testergebnis nur zu Stande kommt, wenn beide Antikörper an das Substrat binden, macht den ELISA zu einer sehr spezifischen Testmethode.

In diesem Fall wurde ein kommerzieller ELISA (Cusabio) verwendet, um die Konzentration von BTN3A1 in Lösung spezifisch nachzuweisen. Ziel war herauszufinden, ob die Vorinkubation von Tumorzellen mit Aminobisphosphonaten oder Statinen zu einer Sekretion oder Abspaltung (*Shedding*) von BTN3A1 führt. Ferner wurde auch untersucht, ob eine Erhitzung der Tumorzellen über 30 Minuten bei 45 °C mit einem darauffolgenden Waschschrift zu Expressionsveränderungen führt. Dazu wurden Tumorzellen unter verschiedenen Bedingungen über Nacht inkubiert. Verwendet wurden dabei die B-Zell-Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji, die monozytäre Leukämiezelllinie THP1, die Glioblastomzelllinie T-98 und die Pankreastumorzelllinien Panc89 und Colo357. Inkubiert wurden je 400.000 Tumorzelllinien in 3 mL Medium. Die Tumorzellen wurden entweder unbehandelt belassen, mit 20 µM Zoledronat oder 5 µM Lovastatin vorinkubiert oder 2 Stunden bei 42 °C erwärmt.

Die Überstände wurden bei 137 rcf 5 Minuten zentrifugiert, der jeweilige Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß übertragen und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend 20 Minuten in 400 µl Lysepuffer (RIPA) inkubiert. Die übrigen adhärennten Zellen wurden mechanisch mittels Zellschaber vom Boden abgelöst und ebenfalls in ein separates Eppendorfgefäß gegeben, um anschließend als Lysate analysiert zu werden. Die Tumorzell-Lysate wurden 10 Minuten bei 10.000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

In Zellüberständen wurde unter Verwendung des BTN3A1-ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers die BTN3A1-Konzentration ermittelt.

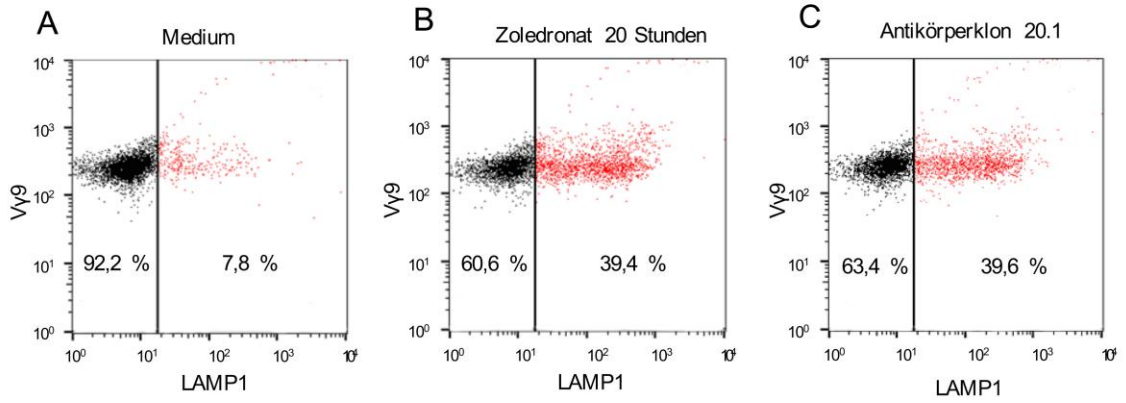


## 4. Ergebnisse

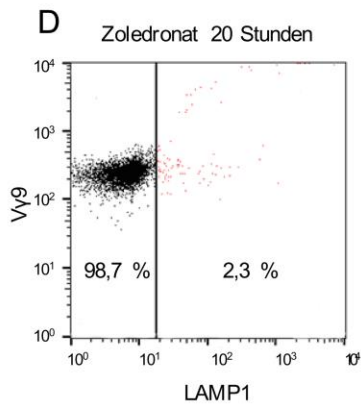
### 4.1. Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch BTN3A-Antikörper

Anti-BTN3A-Antikörper, können ähnlich wie Zoledronat und Phosphoantigene wie BrHPP die Reaktivität von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen gegenüber Tumorzellen beeinflussen (Harly et al, 2012). Um diese Effekte zunächst zu bestätigen, wurden Tumorzellen (THP1) mit den BTN3A-Antikörpern (Klon 20.1 und 103.2) vorbehandelt und anschließend gewaschen. Der Einfluss auf die Degranulierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen als Korrelat der zytotoxischen Aktivität wurde anschließend in Kokultur mit den Tumorzellen untersucht. Dabei diente die CD107a (LAMP-1) Translokation zur Zelloberfläche von  $\gamma\delta$  T-Zellen als Marker der zytotoxischen Aktivität. Ohne Vorbehandlung der Tumorzellen war nur eine sehr geringe LAMP1-Oberflächenexpression zu feststellbar (Abbildung 4.1 A). Erst die Vorinkubation von THP1 mit Zoledronat führte zu einer Zunahme von LAMP-1 auf der Oberfläche. Der inhibitorische Antikörperklon 103.2 unterdrückte dies (Abbildung 4.1 B und D). Wurde allerdings derselbe Antikörperklon zur Vorbehandlung der Tumorzellen genutzt und die Tumorzellen anschließend gewaschen, führte er nicht zu einem Rückgang der  $\gamma\delta$  T-Zell Reaktion, wie es in diesem Fall anhand der Reaktion auf das lösliche BrHPP gezeigt wurde (Abbildung 4.1 E und F). Somit scheint ein möglicher Effekt des inhibitorischen Antikörperklon an der Tumorzelloberfläche zumindest nicht ausreichend zu sein, um die Stimulation von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen durch BrHPP zu unterbinden, da sich in Lösung befindliche Antikörper durch die Waschschrte entfernt wurden. Anders verhielt sich der stimulierende Antikörperklon 20.1. Wurden Tumorzellen mit diesem Antikörper vorbehandelt, konnten auch weitere Waschschrte den stimulierenden Effekt auf  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht unterbinden (Abbildung 4.1 C). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Antikörperklon 20.1 aktivierend auf BTN3A-Moleküle der Tumorzellen und auf  $\gamma\delta$  T-Zellen ausübt. Somit wurde bestätigt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen sich durch BTN3A1-abhängige Stimuli, wie dem IPP anreichernden Zoledronat, dem an  $\gamma\delta$  T-Zellen wirkenden HMBPP und den anti-BTN3A-Antikörper 20.1 aktivieren lassen.

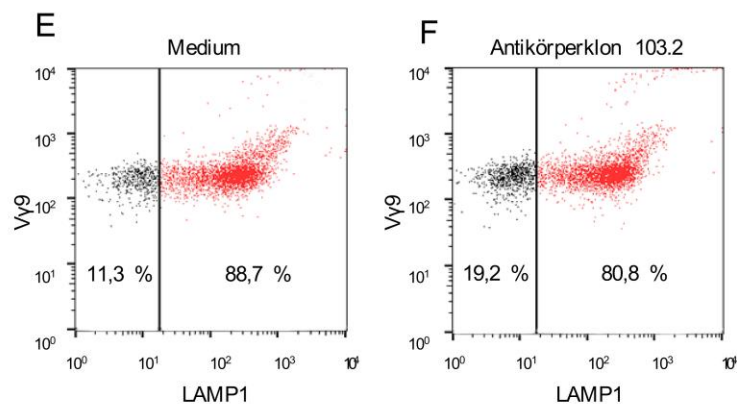
Ohne Stimulus in Lösung kokultiviert



Mit dem Antikörperklon 103.2 in Lösung kokultiviert



Mit BRHPP in Lösung kokultiviert



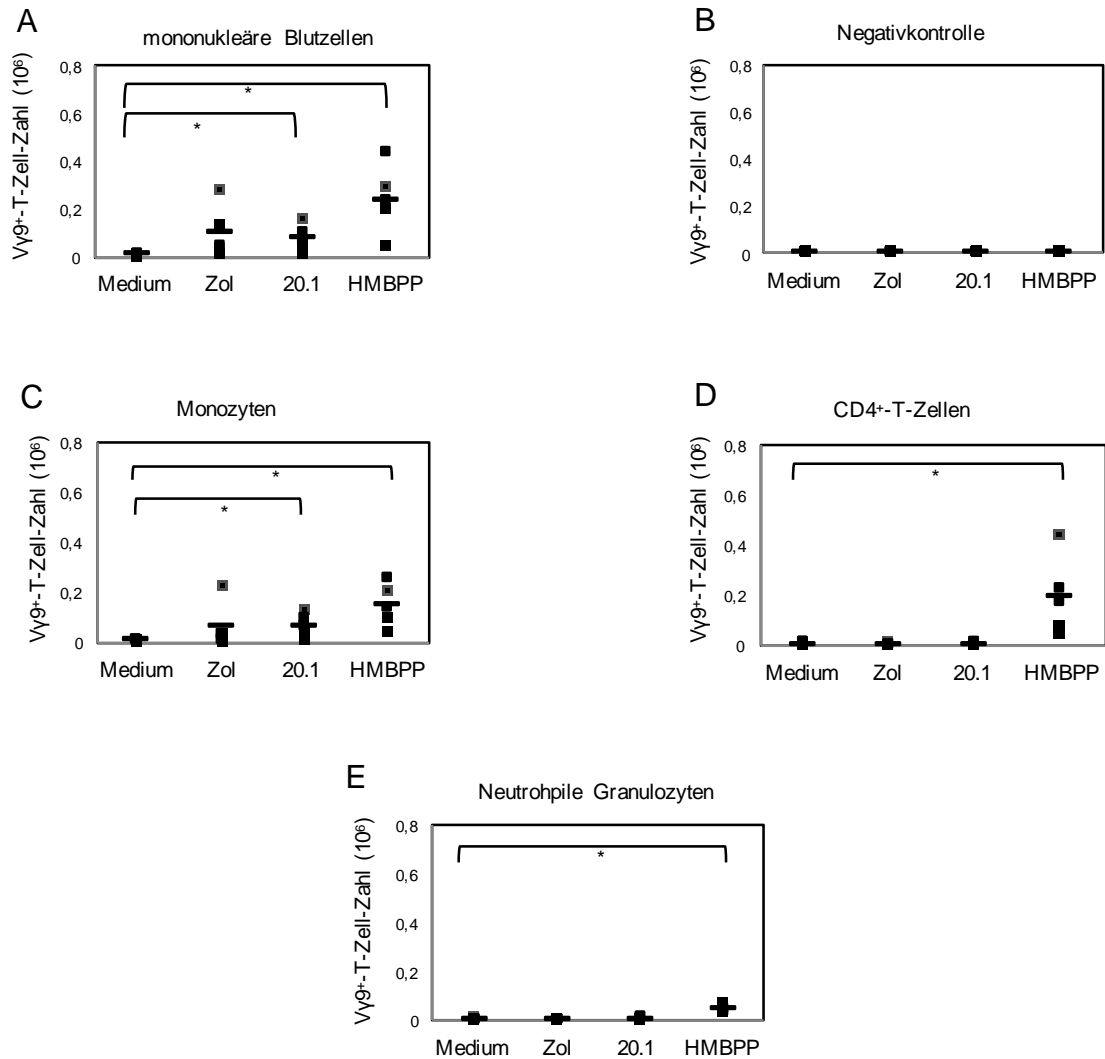
**Abbildung 4.1:** LAMP1-Oberflächentranslokation auf aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen. Tumorzellen (THP1) wurden mit Zoledronat oder Antikörpern (20.1 oder 103.2) vorbehandelt und gewaschen. Danach wurden sie mit  $\gamma\delta$  T-Zellen teilweise unter Zugabe von BrHPP kokultiviert. Gezeigt ist die LAMP1-Oberflächenexpression an  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen an einem repräsentativen Experiment. Dabei sind Ergebnisse abgebildet für unbehandelte (A), mit Zoledronat (B) oder mit dem anti-BTN3A-Antikörperklon 20.1 (C) vorbehandelte Tumorzellen, bei denen keine zusätzliche Substanz während der Zeit der Kokultivierung zugegeben wurde. Zusätzlich wurden die Tumorzellen nach gleichem Schema mit Zoledronat vorbehandelt, allerdings gemeinsam mit dem anti-BTN3A-Antikörperklon „103.2“ in Lösung kokultiviert (D). Derselbe Antikörper wurde dann auch für die Vorbehandlung der Tumorzellen verwendet und dann mit der  $\gamma\delta$  T-Zell-stimulierenden Substanz BrHPP in Lösung mit  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen kokultiviert (F). Als Kontrolle dazu wurden auch nicht vorbehandelte Tumorzellen mit  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen unter Zugabe von BrHPP inkubiert (E). Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich um ein repräsentatives Experiment von insgesamt 9 durchgeführten.

## 4.2. Die Rolle von antigenpräsentierenden Zellen

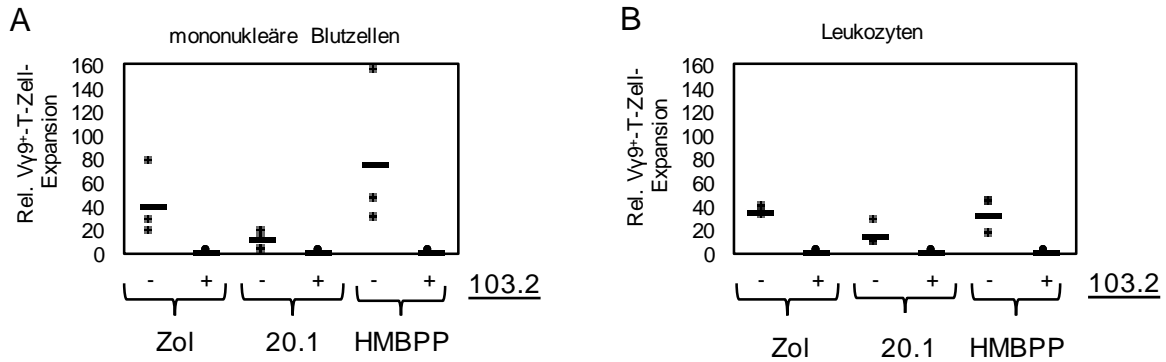
In den gezeigten Experimenten wurde die zytotoxische Aktivität von  $\gamma\delta$  T-Zellen auf Tumorzellen betrachtet. Allerdings ist noch ein weiterer Aspekt wichtig, wenn es um die potentielle Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Tumorthherapie geht, nämlich die optimale  $\gamma\delta$  T-Zell-Expansion. Obwohl BTN3A für die Aktivierung von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen unerlässlich ist, ist die Rolle von Monozyten, Granulozyten und  $\alpha\beta$  T-Zellen als akzessorische Zellen weniger gut charakterisiert. Um dies zu untersuchen haben wir frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen mit ebenfalls frisch isolierten neutrophilen Granulozyten, CD4 T-Zellen oder Monozyten als „antigen-präsentierende Zellen“ kokultiviert. Dabei wurden jeweils 100.000 Leukozyten zu 10.000 gereinigten  $\gamma\delta$  T-Zellen zugesetzt. Zusätzlich wurde mit HMBPP, BrHPP, Zoledronat oder mit dem BTN3A-Antikörperklon 20.1 unter Zugabe von IL-2 (50 IU/mL) stimuliert.

Wurden gereinigte  $\gamma\delta$  T-Zellen ohne zusätzliche Leukozytenpopulationen kultiviert, zeigte sich nach 8 Tagen Kulturdauer nach Zugabe von HMBPP (oder BrHPP), Zoledronat oder Antikörper 20.1 keine  $\gamma\delta$ -T-Zell-Expansion (Abbildung 4.2 B). In Gegenwart von Monozyten konnten alle drei Stimuli (exogene Pyrophosphate, Zoledronat und Antikörper 20.1) eine Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen induzieren (Abbildung 4.2 C). In Kokultur mit neutrophilen Granulozyten war nur bei Zugabe exogener Pyrophosphate ein geringes  $\gamma\delta$  T-Zell-Wachstum erkennbar (Abbildung 4.2

E). Ein weiterer möglicher Interaktionspartner mit  $\gamma\delta$  T-Zellen sind  $\alpha\beta$  T-Zellen. Die mittels MACS isolierten CD4 T-Zellen exprimieren in ihrer großen Mehrzahl den  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor. In Anwesenheit von CD4 T-Zellen wurde nur bei Zugabe löslicher Phosphoantigene wie HMBPP eine Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen festgestellt (Abbildung 4.2 D). Der Antikörper 20.1 induzierte in Kokultur mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls keine Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Auch der Effekt des Antikörperklons 103.2, der bereits in den bisherigen Experimenten als inhibitorisch auf die  $\gamma\delta$ -T-Zell Aktivität wirkte, wurde untersucht. Dabei wurden PMBZ oder Leukozyten, unter denen sich auch  $\gamma\delta$  T-Zellen befinden, neben den bisher genannten Stimuli (Zol, 20.1 und HMBPP) auch mit dem 103.2-Antikörper inkubiert. Dort war zu beobachten, dass der Antikörperklon, nicht nur die zytotoxische Aktivität (Kapitel 4.1), sondern auch die Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge aller drei Stimuli unterdrückt (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.2:**  $\gamma\delta$  T-Zell-Expansion an mononukleären Blutzellen (A) oder nach 7-tägiger Mono- oder Kokultur mit oder ohne Stimulation (B-E). Mononukleäre Blutzellen (A) oder isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen (B) wurden Anwesenheit verschiedener  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimuli kultiviert: Zoledronat (Zol), einen stimulierenden Anti-BTN3A-Antikörperklon („20.1“) und dem Pyrophosphat HMBPP. Ferner wurden auch 10.000 isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen in Monokultur (B) oder in Kokultur mit je 50.000 Monozyten (C), CD4<sup>+</sup> T-Zellen (D) oder neutrophiler Granulozyten (E) angelegt und nach 7 Tagen gemessen. Auch hier waren jeweils die verschiedenen Stimuli anwesend. Gezeigt ist die Absolutzellzahl der V $\gamma$ 9 T-Zellen aus verschiedenen Experimenten, die mittels SCDA ermittelt wurde (n=5; p<0,05).



**Abbildung 4.3:**  $\gamma\delta$  T-Zell-Expansion nach 8-tägiger Kokultur mit unterschiedlichen Stimuli. Frische mononukleäre Blutzellen (A) oder Leukozyten (B) wurden mit 5  $\mu$ M Zoledronat (Zol), 40 ng/mL anti-BTN3A Antikörper (20.1) oder 1 nM HMBPP unter Zugabe von IL-2 stimuliert. Die Zellen wurden dann so belassen (-) oder mit dem inhibitorischen anti-BTN3A Antikörper (103.2) inkubiert (+). Angegeben ist das Verhältnis der gesamten  $V\gamma 9$  T-Zellen nach 8 Tagen zu deren Anzahl an Tag 0.

### 4.3. BTN3A-Oberflächenexpression

Da sich Monozyten, Granulozyten und  $CD4^+$  T-Zellen offensichtlich in ihrer Aktivität als akzessorische Zellen für die  $\gamma\delta$ -T-Zellaktivierung durch Phosphoantigene, Zoledronat und den anti-BTN3A Antikörper 20.1 unterscheiden, andererseits aber alle Stimuli BTN3A-abhängig sind, wurde als nächstes die Oberflächenexpressionen von BTN3A verglichen. Dabei wurden Monozyten, Granulozyten sowie  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht. Hierzu wurden Gesamt-Leukozyten mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen CD14, CD66b, CD3 und  $V\gamma 9$  samt BTN3A angefärbt. In der FACS-Analyse wurden entsprechende Fenster („Gates“) abgegrenzt, um BTN3A gezielt auf  $CD14^+$ -Monozyten,  $CD66b^+$ -Granulozyten,  $CD3^+$ - $\alpha\beta$ - oder  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $CD3^+$ - $V\gamma 9^+$ - $\gamma\delta$  T-Zellen zu untersuchen.

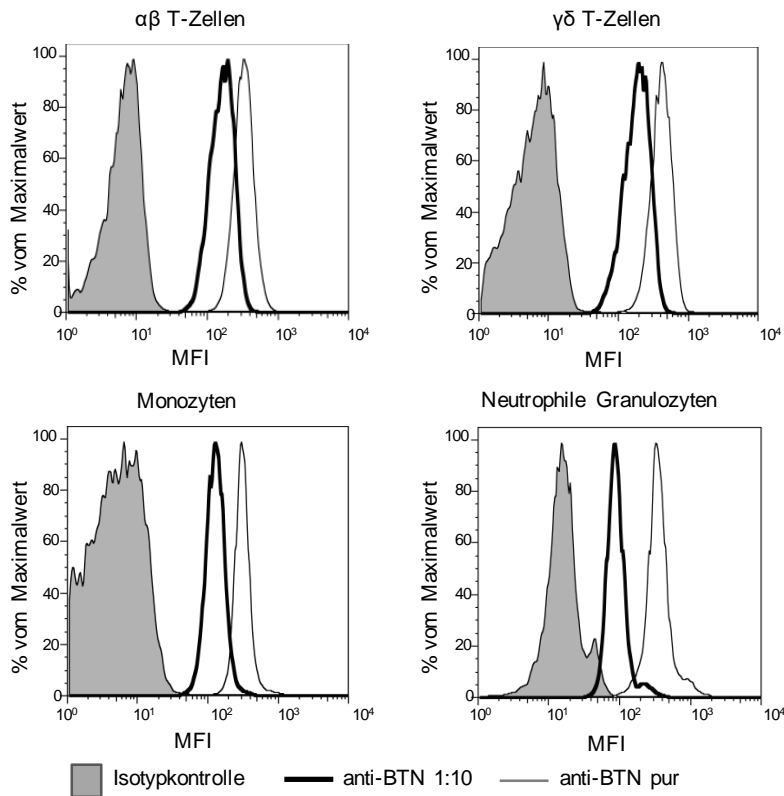
Hierbei zeigte sich, dass sowohl  $\gamma\delta$  als auch  $\alpha\beta$  T-Zellen auf der Zelloberfläche BTN3A exprimieren. Ebenso exprimierten CD14<sup>+</sup> Monozyten deutlich BTN3A an der Zelloberfläche. CD66<sup>+</sup> Granulozyten exprimierten bei unverdünntem Einsatz des Antikörpers ebenfalls BTN3A mit starker Intensität, während die Färbung bei 1:10 verdünntem Antikörper deutlich weniger intensiv war als auf den anderen Leukozytenpopulationen (Abbildung 4.4).

Tumorzellen werden nach Vorbehandlung mit Zoledronat deutlich besser von  $\gamma\delta$  T-Zellen lysiert als ohne diese Vorbehandlung. Es stellte sich die Frage, ob durch die Zoledronat-Vorbehandlung die Oberflächenexpression von CD277/BTN3A moduliert wird. Für die untersuchten Tumorzelllinien zeigten sich nach Zoledronat-Vorbehandlung jedoch keine deutlichen oder einheitlichen Effekte auf die Oberflächenexpression von BTN3A. Allerdings wiesen die verschiedenen Tumorzelllinien untereinander Unterschiede auf:

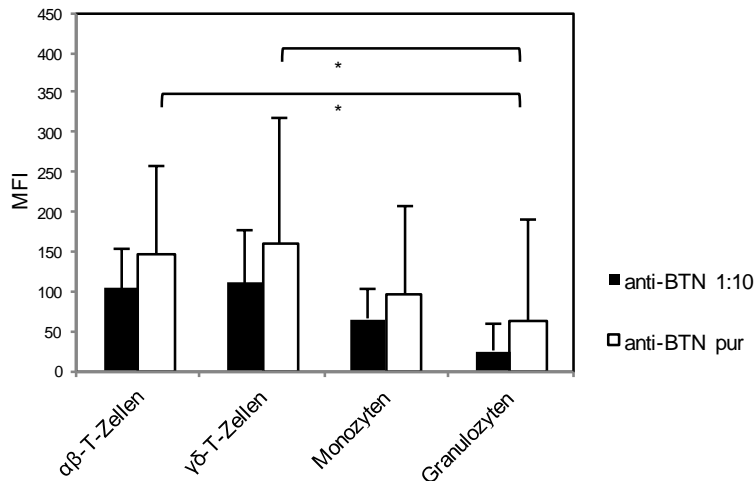
Die Erythroblasten Leukämie K562, das histiozytäre Lymphom U937 und die Monozytenleukämie THP1 – in Abbildung 4.5 A als repräsentatives Histogramm dargestellt - wiesen eine geringere Oberflächenexpression auf, aber auch auf der Glioblastomzelllinie U87 und der Pankreastumorzelllinie Colo357 war eine geringere Oberflächenexpression im Vergleich zur Tumorzelllinie Panc89, die sich ebenfalls vom Pankreaskarzinom ableitet (Abbildung 4.5 B).

Da für die nachfolgenden Experimente neben der CD277-Oberflächenexpression auf Tumorzellen auch deren Suszeptibilität gegenüber  $\gamma\delta$ -T-Zell-vermittelter Lyse entscheidend ist, sollte diese nun in weiteren Experimenten zwischen den Tumorzelllinien verglichen werden

A

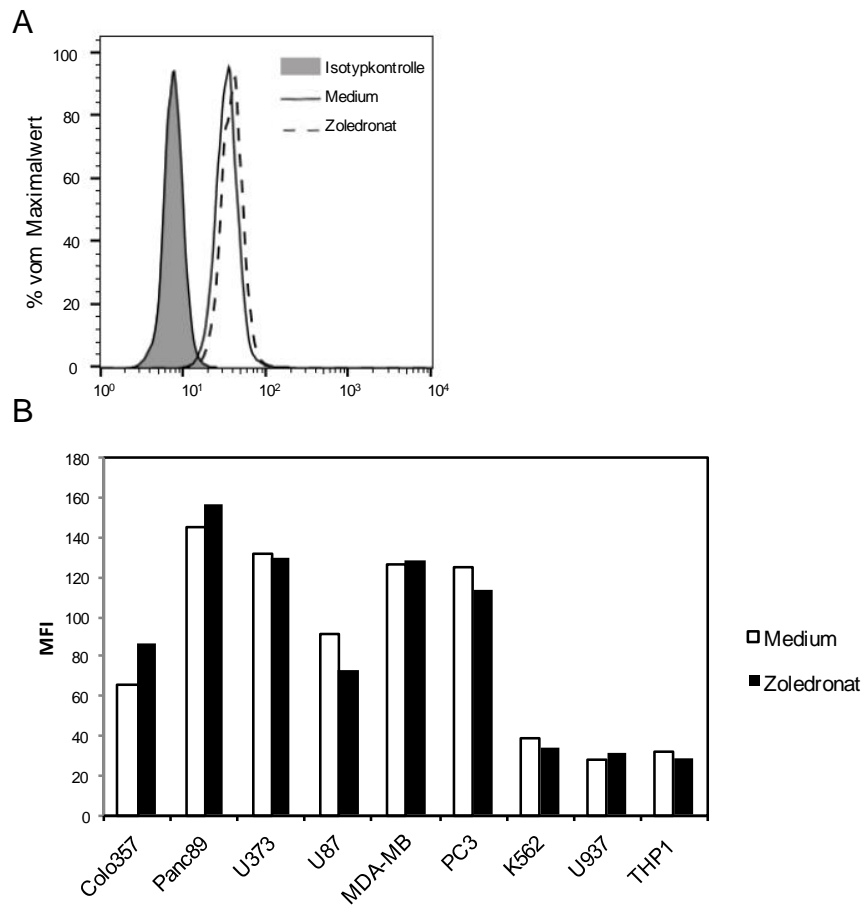


B



**Abbildung 4.4:** BTN3A-Oberflächenexpression auf verschiedenen Leukozytenpopulationen. Leukozyten wurden aus Vollblut verschiedener Spender jeweils nach dem selben Protokoll isoliert, mit verschiedenen Antikörpern anhand von Oberflächenstrukturen identifiziert (CD14, CD66b und V $\gamma$ 9) und mit dem anti-BTN3A Antikörperklon 20.1 gefärbt. Gezeigt sind Histogramme der Durchflusszytometrie von je 5000 untersuchten Zellen (A). Ferner ist die Statistik für mehrere Experimente aufgeführt, wobei der für die Oberflächenfärbung verwendete Antikörper sowohl pur (n=6), als auch 1:10 verdünnt (n=3) verwendet wurde. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der Probe abzüglich der Isotypkontrolle (B) (n=3) (p<0,05).





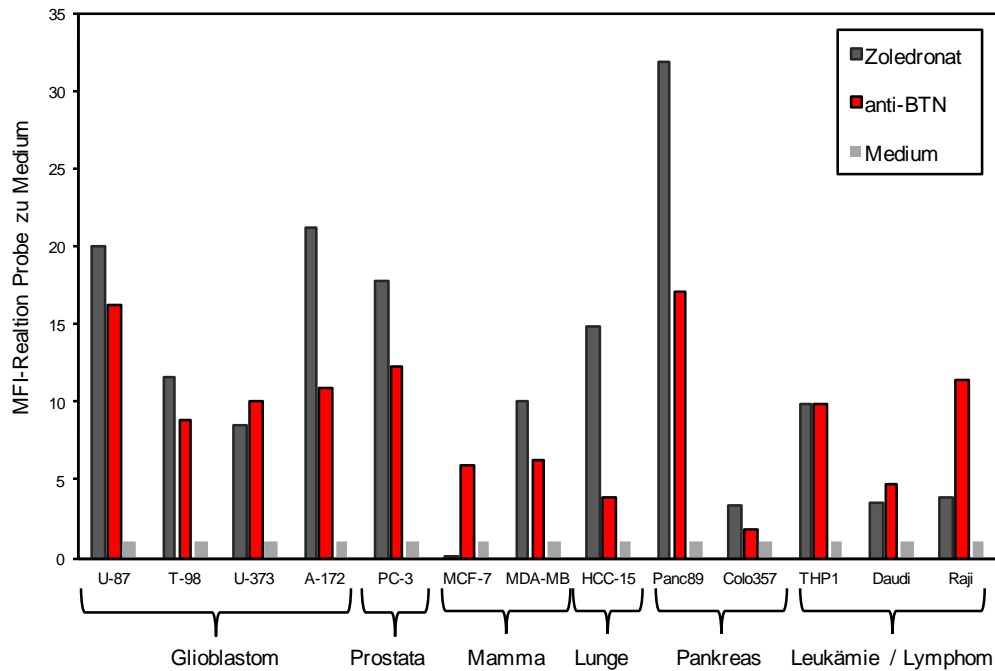
**Abbildung 4.5:** Einfluss von Zoledronat auf die BTN3A-Oberflächenexpression auf A) THP1 Zellen und B) weiteren Tumorzelllinien. Die Zellen wurden mit dem anti-BTN3A Klon 20.1 gefärbt auf die BTN3A-Oberflächenexpression. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Hierbei wurde ein *Screening*-Experiment durchgeführt.

#### 4.4. $\gamma\delta$ T-Zellreaktivität gegenüber Tumorzelllinien

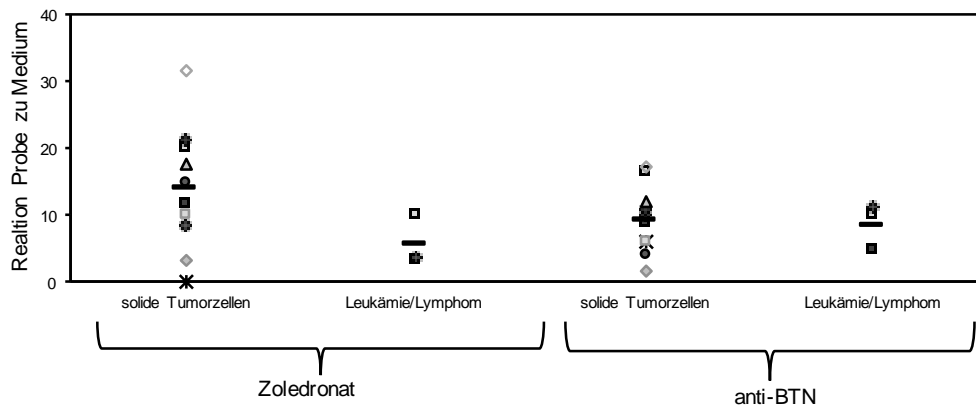
Eine geringere BTN3A-Oberflächenexpression auf Tumorzellen muss nicht gleichbedeutend sein mit einer geringeren Suszeptibilität gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die Suszeptibilität mehrerer unterschiedlicher Tumorzelllinien wurde Anhand der LAMP1-Oberflächentranslokation an  $\gamma\delta$  T-Zellen, nach Koinkubation mit Tumorzellen, untersucht. Zur Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden BrHPP, Zoledronat und der aktivierende anti-BTN3A-Antikörper (Klon: 20.1) verwendet. Es zeigte sich eine erhebliche Heterogenität der Tumorzelllinien in ihrer Suszeptibilität gegenüber Lyse durch  $\gamma\delta$  T-Zellen:  $\gamma\delta$  T-Zellen reagierten gut auf Zoledronat- oder 20.1-vorbehandelte Glioblastomzelllinien, während sich bei jeweils 2 untersuchten Mamma- und Pankreastumorzelllinien je eine als suszeptibel bzw. eine als resistent erwies. Auffällig war dabei, dass die suszeptiblen Tumorzelllinien (Panc89 und MDA-MB231) jeweils nicht von Primärtumoren, sondern von Metastasen abstammen (Abbildung 4.6 A). Solide Tumorzellen waren in diesem Experiment empfindlicher für eine Erkennung durch  $\gamma\delta$  T-Zellen. (Abbildung 4.6). Aufgrund ihrer einfachen Handhabung als Suspensionskultur und der guten Reaktivität der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei allen verwendeten Stimuli, wurden die folgenden Experimente mit der Leukämiezelllinie THP1 durchgeführt (Abbildung 4.6 B).

Zu klären verbleibt allerdings noch, worauf die Suszeptibilität der Tumorzellen beruht. Neben einer veränderten quantitativen Oberflächenexpression von BTN3A1 könnten sich auch strukturelle Veränderungen infolge der Zoledronat-Stimulation ergeben, wie z.B. die Ausbildung von Konglomeraten von BTN3A1-Molekülen auf der Zelloberfläche, die vielleicht besser von  $\gamma\delta$  T-Zellen erkannt werden.

A



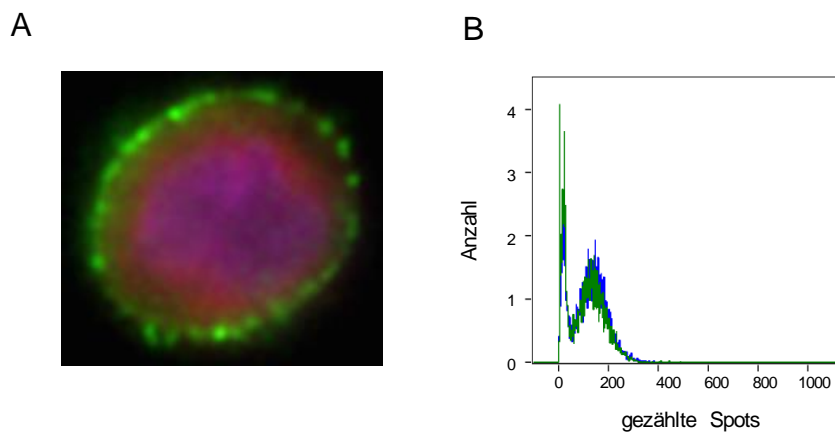
B



**Abbildung 4.6:** Vergleich verschiedener BTN3A-abhängiger Stimuli zwischen verschiedenen Tumorzelllinien: Zoledronat und der Antikörperklon 20.1 (A). Gezeigt ist die LAMP1-Oberflächentranslokation in Relation zu der unstimulierten Probe. Alle verwendeten Zelllinien wurden ferner in solide und Suspensions-Tumorzelllinien unterteilt und aus den Daten miteinander verglichen (B). Gezeigt ist ein einmalig durchgeführtes *Screening*-Experiment.

Um diese Veränderungen an der Zellmembran darzustellen wurden THP1-Zellen unbehandelt oder mit Zoledronat über Nacht vorinkubiert mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit einem BTN3A-Antikörper (Klon: 20.1) gefärbt. Anschließend

wurden die Zellen mit der *Imagestream*-Zytometrie gemessen. Es wurden dann im grünen Farbkanal, in dem BTN3A markiert war, mithilfe der zugehörigen Software farbintensive Areale erkannt, gezählt und ausgewertet. Gezeigt ist in Abbildung 4.7 B ein Histogramm der gezählten Agglomerate in Abhängigkeit von der Vorinkubation der Tumorzellen (unstimuliert oder Zoledronat). Zwar lässt sich an den Aufnahmen von Einzelzellen (Abbildung 4.7 A) optisch erahnen, dass BTN3A an der Zelloberfläche Agglomerate bildet und nicht äquidistant verteilt ist; allerdings zeigt die statistische Auswertung keine deutlichen Unterschiede zwischen unstimulierten und mit Zoledronat vorbehandelten Tumorzellen (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7:** BTN3A wurde in FA-fixierten THP1-Tumorzellen markiert und mit der *Imagestream*®-Durchflusszytometrie gemessen. Dabei wurden epifokale Bilder der untersuchten Tumorzellen aufgenommen. Dabei wurde der Zellkern mit Hoechst, die Zellmembran mit CellMask und BTN3A mit dem Antikörperklon 20.1 angefärbt. A) Abgebildet ist die Aufnahme einer einzelnen THP1-Tumorzelle (Grün ist BTN3A, Rot die Zellmembran und Violett der Zellkern). B) Die Anzahl fluoreszenzintensive Punkte (Spots) ist für 5000 gemessene Zellen, die entweder mit Zoledronat stimuliert wurden (blau) oder unstimuliert blieben (grün) im Histogramm dargestellt. Dies ist ein beispielhaftes Experiment (n=3).

#### 4.5. BTN3A1-ELISA

Verschiedene Tumorzelllinien wurden mit Zoledronat oder Lovastatin – einer Substanz aus der Gruppe der Statine, die intrazelluläre IPP-Spiegel senkt (Thompson und Rogers 2003) - vorbehandelt. Dadurch sollten die intrazellulären IPP-Spiegel angehoben oder gesenkt werden. Die Freisetzung von BTN3A1 wurde

mit einem kommerziellen BTN3A1-ELISA untersucht. Dabei wurden sowohl die Überstände der stimulierten Zellen, als auch Zelllysate für die Analyse verwendet. Obwohl der ELISA vom Hersteller als „BTN3A1-spezifisch,“ deklariert wird, war es nicht möglich die enthaltenen Antikörper zu identifizieren. Mit dem ELISA sollte untersucht werden, ob BTN3A1 eventuell von Tumorzellen sezerniert („geshededt“) werden kann und dies z.B. durch Zoledronat beeinflusst wird. Gleichzeitig sollte BTN3A1 in Zelllysaten quantifiziert werden, um Unterschiede in der zellulären BTN3A1-Protein-Expression zu bestimmen. Deswegen wurden sowohl Lysate der Tumorzellen als auch Mediumüberstände untersucht. Die Tumorzellen wurden mit Medium, Zoledronat, BrHPP und Lovastatin vorbehandelt. BTN3A1 konnte jedoch bei keiner der Stimulationen im Überstand nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle dienten dabei Tumorzelllysate.

#### 4.6. BTN3A-interagierende Proteine

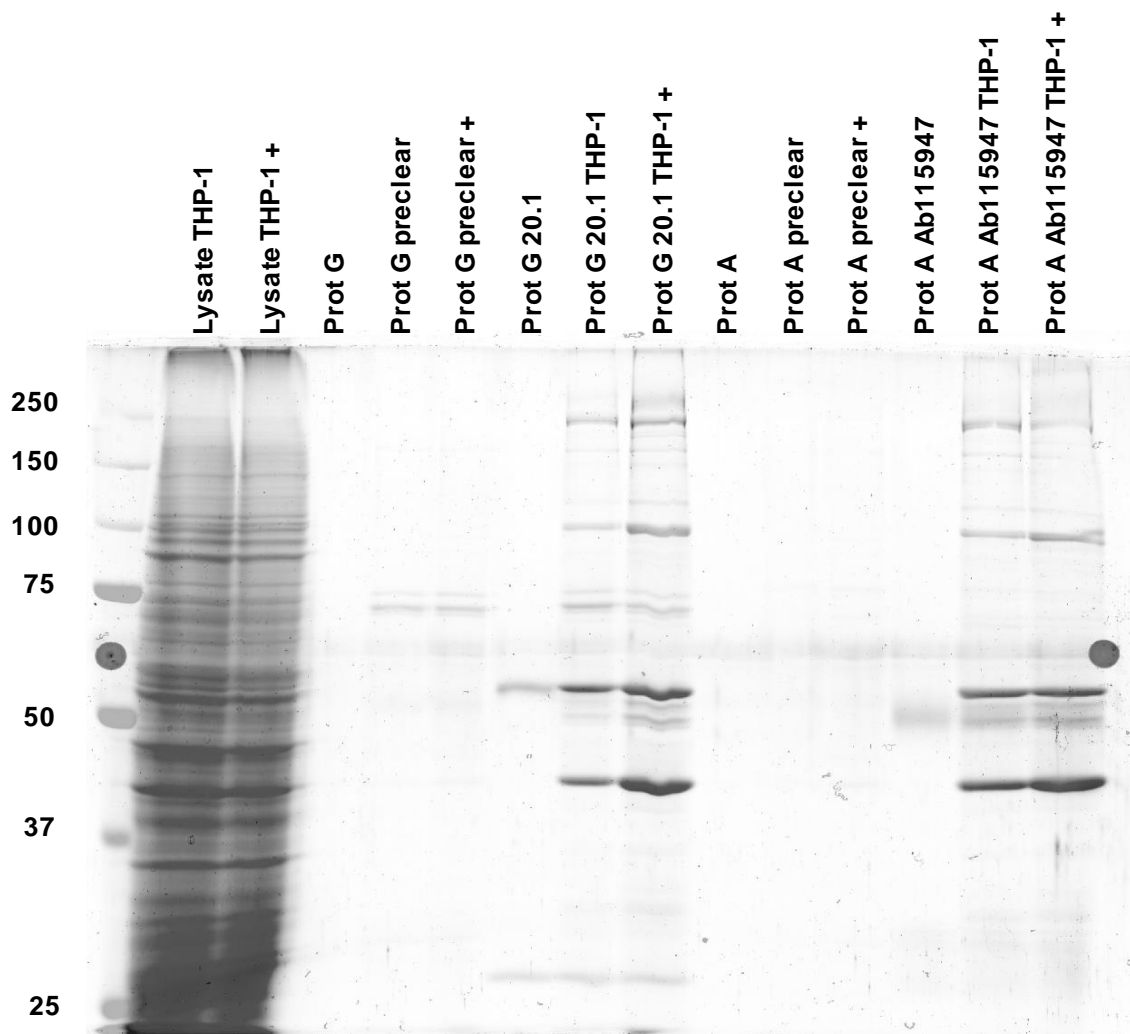
Die beschriebene Rolle der intrazellulären Domäne von BTN3A1 für  $\gamma\delta$  T-Zellaktivierung lässt vermuten, dass BTN3A1 dazu mit weiteren intrazellulären Proteinen interagiert. Mittels Kopräzipitation sollten daher mögliche Interaktionspartner von BTN3A1 vor und nach Stimulation mit Zoledronat identifiziert werden.

Dazu wurden sowohl der monoklonale anti-BTN3A-Antikörper 20.1 als auch zwei gegen die intrazelluläre Domäne gerichtete polyklonale anti-BTN3A1-Antikörper eingesetzt. Spezifisch ko-präzipitierte Proteine könnten potentielle Bindungspartner von BTN3A1 darstellen, die auch an der Signalweiterleitung nach Bindung von IPP an die intrazelluläre Domäne beteiligt sein können.

Abbildung 4.8 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer entsprechenden Immunpräzipitation aus THP1-Zellen. Die Zellen wurden entweder direkt aus der Kultur entnommen oder vor der Lyse mit Zoledronat aktiviert. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die enthaltenen Proteine anschließend mit dem sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Pink angefärbt. In den Gesamtlysaten

waren unter diesen Bedingungen keine wesentlichen Unterschiede im Bandenmuster zwischen Zoledronat-behandelten und unbehandelten Zellen erkennbar. Die zur Vorreinigung verwendeten Protein G oder Protein A *beads* präzipitierten alleine kaum unspezifische Banden. Die Bandenmuster der eigentlichen Präzipitate ließen vermuten, dass aus den mit Zoledronat vorbehandelten Tumorzellen möglicherweise mehr Protein ko-präzipitiert wurde. Gleichzeitig scheinen in der Tat einige Proteine sowohl mit dem monoklonalen Antikörper und Protein G wie auch mit den polyklonalen Antikörpern und Protein A selektiv zu präzipitieren: Die Bande zwischen 50 und 60 kDa könnte anhand der parallel durchgeführten Western Blots eine Überlagerung von BTN3A1 und der schweren Antikörperkette darstellen. Die Isoformen BTN3A2 und BTN3A3 weisen Molekülmassen von 37 und 65 kDa auf.

Zur Identifizierung der Proteine wurden Spots aus den entsprechenden Banden gestanzt, die anschließend zur massenspektrometrischen Analyse vorbereitet wurden. Die hierbei identifizierten Bindungspartner sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Es wurden Proteine mit unterschiedlichen Funktionen gefunden, beispielsweise solche mit Bedeutung bei der Ausbildung und Organisation des Aktin Zytoskeletts. Dazu zählte Aktin oder sowie Aktin-bündelnde bzw. -quervernetzende Proteine wie  $\alpha$ -Actinin, Spectrin oder F-actin-capping protein (Honda et al. 1998; Zhang et al. 2013; Shekhar et al. 2016). Auch Bestandteile von Intermediärfilamenten wie Vimentin wurden identifiziert (Shi et al. 2016).



**Abbildung 4.8:** Immunpräzipitation von potentiellen Bindungspartnern des BTN3A1. THP1-Zellen wurden über Nacht unstimuliert belassen (-) oder mit 20  $\mu$ M Zoledronat (+) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und zunächst mit Protein G oder Protein A microbeads vorinkubiert (preclear). In einem nächsten Schritt wurden die Lysate mit anti-CD277 Antikörper gebundenen Protein G oder Protein A microbeads inkubiert. Verwendet wurden dabei der Antikörperklon 20.1 und ein polyklonaler gegen die intrazelluläre BTN3A1-Domäne gerichteter Antikörper Ab115947. Gezeigt ist eine Flamingopink-Färbung.

Ferner wurden Proteine identifiziert, die auf zellulären Stress, wie Hitzeschock, Hypoxie oder oxidativen Stress hinweisen, nämlich das *78 kDa glucose-regulating protein* (Ni et al. 2011), *heat shock protein 70* (Murphy 2013) und *heat shock cognate 71 kDa protein* (Yahata et al. 2000). Allerdings wurden diese nicht in Zoledronat vorbehandelten Zellen gefunden und eine erhöhte BTN3A-Oberflächenexpression durch Hitze konnte in durchgeführten Experimenten nicht reproduzierbar gezeigt werden; ebenso wenig zeigte sich in einem einmalig durchgeführten BTN3A1-ELISA ein erhöhtes intrazellulärer BTN3A1-Spiegel.

Des Weiteren wurde ein Spannungs-gesteuerter, mitochondrialer Ionenkanal ebenfalls als potenzieller Interaktionspartner von BTN3A1 identifiziert: *Voltage dependent anion channel protein 1* oder *2*. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie waren hinsichtlich der Isoform nicht eindeutig. Derartige Ionenkanäle spielen eine Rolle im Rahmen der Transport- oder Apoptose-Regulation (Verrier et al. 2003). Eine Rolle bei der Apoptose scheint auch das *EF-hand domain containing protein D2* zu spielen (Kim et al. 2013).

Interessante Interaktionspartner wären auch Proteine des zellulären Energiehaushalts: Die  $\beta$ -Galaktosidase (Distler, Jourdian 1973), das *IQ-motif containing Ras-GTPase activating like protein* (IQGAP1) (Maertens und Cichowski 2014) und das *mitochondrial inner membrane protein* (Stiburek et al. 2007) zählen aber leider auch zu den häufig als falsch-positiv benannten Interaktionspartnern.



Tabelle 4.1: Mögliche Bindungspartner an BTN3A		
Protein	Aufgetreten in	Funktionen
Zytoskelett assoziierte Proteine		
<b>Actin, cytoplasmatic 1 und cytoplasmatic 2</b>	Medium und Zolderonat	Ausbildung des Zytoskeletts
<b><math>\alpha</math>-actinin 4</b>	Medium und Zoledronat	Zellmigration, Zelladhäsion und zytoskeletaler Stabilität.
<b>Clathrin heavychain</b>	Medium und Zoledronat	Vesikelformation im Trans-Golgi-Netzwerk
<b>Drebrin</b>	Medium	Zytoskelettale Funktionen
<b>F-actin-capping protein subunit alpha-1</b>	Zoledronat	Regulation des Aufbaus von Aktinfilamenten
<b>Spectrin beta chain, non-erythrocytic</b>	Zoledronat	Kalzium-abhängige Zytoskelettmigration
<b>Vimentin</b>	Medium	RNA-Bindung, Glycoproteinbindung, zytoskelettale Funktionen
Stressproteine		
<b>Heat shock cognate 71 kDa protein</b>	Medium	Transkriptionaler Repressor
<b>Heat shock protein 70, mitochondrial</b>	Medium	ATP-Bindung, poly(A) RNA Bindung, Ubiquitin-Proteinligase-Bindung, Bindung ungefalteter Proteine.
<b>78 kDa Glukose-regulating protein</b>	Medium	Vermutlich Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum
Zellulärer Energiehaushalt		
<b><math>\beta</math>-Galaktosidase</b>	Medium	Kohlenhydratmetabolismus
<b>IQ-motif containing Ras-GTPase-activating like protein 1</b>	Medium	GTPase-Aktivierung
<b>Mitochondrial inner membrane protein</b>	Medium	Integration mitochondrialer Proteine
Zelltodregulation		
<b>EF-hand domain containing protein D2</b>	Medium und Zoledronat	NF $\kappa$ B-Aktivierung, B-Zell-Apoptoseregulation
<b>Voltage dependent anion channel protein 1 oder 2</b>	Zoledronat	Spannungsgesteuerter mitochondrialer Ionenkanal

## 5. Diskussion

### 5.1 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen erkennen Pyrophosphate

In den Experimenten dieser Doktorarbeit wurden ausschließlich V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen untersucht. Als stimulierende Liganden für V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen sind Pyrophosphate beschrieben worden (Harly et al. 2012, Morita et al. 1995). Das konnte in den vorliegenden Experimenten bestätigt werden. Die Zugabe von prokaryotischen Pyrophosphaten wie HMBPP, aber auch die Steigerung intrazellulärer Pyrophosphate durch Zoledronat führte zur selektiven Expansion von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen. Auch bei der Reaktion von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen gegen Tumorzellen zeigte sich eine Aktivierung sowohl bei der Gabe löslicher Pyrophosphate – in diesem Fall BrHPP – als auch nach Zoledronat Vorinkubation. Diese Ergebnisse decken sich mit bereits publizierten Daten, in denen ebenfalls die Translokation des lysosomalen Proteins LAMP1 auf der Zelloberfläche als Messparameter für die zytotoxische Aktivität der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen diente (Harly et al. 2012). Die selektive Proliferation von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen ist auch nach Stimulation mit Pyrophosphaten aus Mykobakterien beschrieben (Morita et al. 2001).

### 5.2. CD277 ist essentiell für die Erkennung von Pyrophosphaten

Der Mechanismus über den die Pyrophosphate erkannt werden ist noch nicht völlig verstanden. Bekannt ist allerdings, dass das Membranmolekül CD277 für diese Reaktion essentiell ist (Harly et al. 2012, Vavassori et al. 2013). Unter dem Namen CD277 werden drei verschiedene Isoformen des Moleküls zusammengefasst: BTN3A1, BTN3A2 und BTN3A3. Dabei kann die Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen durch Pyrophosphate durch den anti-CD277 Antikörperklon 20.1 über jede der drei Isoformen von BTN3A vermittelt werden. Die Stimulation durch Zoledronat erfordert allerdings die Isoform BTN3A1 und des Chromosom 6, auf dem die Basensequenz für dieses Protein codiert ist. (Harly et al. 2012, Riaño et al. 2014). Der molekulare Mechanismus wie intrazelluläre oder extrazelluläre Pyrophosphate BTN3A1-

abhängig  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen aktivieren, ist noch nicht vollständig verstanden. An dem BTN3A1-Molekül sind mehrere Bindungsstellen für Pyrophosphate beschrieben. Es konnte durch Massenspektrometrie eine extrazelluläre Bindungsstelle sowohl für IPP als auch für HMBPP gezeigt werden (Vavassouri et al. 2013). Genauso konnte eine Bindung des immobilisierten  $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR an die extrazelluläre Domäne von BTN3A1 gezeigt werden, die durch Zugabe von IPP verstärkt wurde (Vavassouri et al. 2013). Diese Daten sprechen für eine Präsentationsrolle des extrazellulären Bereichs und eine anschließende Erkennung durch  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen. Nach diesem Modell könnten Pyrophosphate an die extrazelluläre Domäne von BTN3A1 binden und so eine Wechselwirkung mit  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen vermitteln. Dabei ist noch unklar, wie intrazellulär angereicherte Pyrophosphate wie IPP die Zellmembran penetrieren können (Vavassouri et al. 2013). Eine andere Studie hat jedoch eine intrazelluläre Bindung von Pyrophosphaten gezeigt. Demnach könnten intrazelluläre Pyrophosphate wie IPP an die zytoplasmatische B30.2-Domäne des BTN3A1 binden und dort eine Konformationsänderung bewirken, auf die  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen reagieren (Sandstrom et al. 2014). Dieses Modell wird durch weitere Publikationen gestützt (Rhodes et al. 2015, Wang und Morita 2015).

### 5.3. Expression von CD277

CD277 wird im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert. Es findet sich sowohl auf Tumorzellen, als auch auf Immunzellen. Die Ausprägung der Oberflächenexpression wird dabei in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Im Fall der Immunzellen ist eine erhöhte Expression auf T-Zellen im Vergleich zu B-Zellen bereits beschrieben (Compte et al. 2004, Cubillos-Ruiz et al. 2010). In dieser Doktorarbeit konnte mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden, dass Immunzellen CD277 auf der Zelloberfläche ausbilden und dass es Unterschiede in der Oberflächenexpression gibt: Neutrophile Granulozyten exprimieren weniger CD277 an ihrer Oberfläche. Das kann im Zusammenhang mit ihrer geringeren kostimulatorischen Aktivität für  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen stehen, die bereits beschrieben wurde und sich durch die Ergebnisse bestätigt (Abbildung 4.2; Kalyan et al. 2014). Auch an der Oberfläche von Tumorzellen wird CD277 exprimiert. Eine erhöhte Oberflächenexpression auf T-Zell-

Leukämien ist beschrieben. Dabei fanden sich aber auf nahezu allen Tumorzelllinien CD277, so dass das Molekül als Therapiezielstruktur möglicherweise in Frage kommt (Compte et al. 2004). Dabei kann eine potentielle Tumormimmuntherapie auch trotz ubiquitärer Oberflächenexpression auf Tumorzellen möglich sein, wie es beispielsweise beim epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) der Fall ist (Tiel Groenestege et al. 2007). Der gegen diese Struktur gerichtete Antikörper Cetuximab wird bereits mit Erfolg beim kolorektalem Karzinom eingesetzt (Holubec et al. 2016). In den Experimenten dieser Arbeit bestätigte sich, dass Tumorzellen CD277 an ihrer Oberfläche ausbilden. In einem Screeningexperiment wiesen Leukämie- und B-Zell-Lymphom-Zelllinien geringere Oberflächenexpressionen auf, als die zum Vergleich verwendeten soliden Tumorzelllinien (Abbildung 4.6). Um diese Unterschiede zu validieren, wären sicherlich weitere Experimente an größeren Kollektiven erforderlich. Trotzdem ist zu erkennen, dass Leukämie- und Lymphomzelllinien eine geringere Suszeptibilität bei gleichzeitig geringerer CD277-Oberflächenexpression aufweisen, so dass eine erhöhte Oberflächenexpression von CD277 mit der höheren Suszeptibilität gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen verbunden sein könnte. Dagegen spricht allerdings, dass die Vorbehandlung mit Zoledronat zu einer deutlich stärkeren Suszeptibilität gegenüber V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen führt, die CD277-Oberflächenexpression sich jedoch nicht verändert (Abbildung 4.5). Dies wird durch in dieser Arbeit nicht beschriebene Experimente zur CD277-Oberflächenexpression nach Zoledronat-Vorbehandlung bei Tumorzellen aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt.

#### 5.4. Monozyten können $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren, CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe löslicher Pyrophosphate oder anti-BTN-Antikörper

Wie in dieser Arbeit gezeigt weisen alle untersuchten Leukozytenpopulationen BTN3A1-Expression an der Zelloberfläche auf (Abbildung 4.4) und kommen somit prinzipiell als „präsentierende“ Zellen für die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen in Frage. Aus den vorliegenden Experimenten geht hervor, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen ohne Zugabe weiterer akzessorischer Zellen durch keinen der verwendeten BTN3A-abhängigen Stimuli aktiviert werden. Für die Stimulation mit n-BPs ist dies im Konsens mit der Literatur

und vermutlich dadurch erklärbar, dass T Zellen n-BPs nicht intrazellulär aufnehmen (Kalyan et al. 2014). Für lösliche Pyrophosphate wurde gezeigt, dass sie auch  $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone stimulieren können, wenn diese in Monokultur gehalten werden (Miyagawa et al. 2001, Morita et al. 1995). Dieser Widerspruch ist vermutlich dadurch erklärt, dass Morita  $\gamma\delta$  T-Zell-Klone zunächst expandiert und dann deren Aktivität nach Pyrophosphatstimulation gemessen hat. Derart voraktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen haben eine geringere Aktivierungsschwelle im Vergleich zu frisch isolierten unstimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen. Ferner wurden in diesen publizierten Experimenten höhere Zellzahlen eingesetzt, als die in dieser Arbeit verwendeten 10.000  $\gamma\delta$  T-Zellen.

In Kokultur mit Monozyten führten alle Stimuli zu einer Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Dies ist gut mit Experimenten anderer Arbeitsgruppen vereinbar, in denen aus Monozyten generierte dendritischen Zellen nach Vorbehandlung mit Zoledronat  $\gamma\delta$  T-Zellen aktivierten (Fiore et al. 2007). Die intrazelluläre Aufnahme von n-BPs ist für Monozyten und neutrophile Granulozyten gezeigt (Chandasekaran et al. 2015, Kalyan et al. 2014). Für Monozyten ist weiterhin beschrieben, dass die Vorbehandlung mit n-BPs zu einem erhöhten intrazellulären IPP-Spiegel führt (Roelofs et al. 2009). Für andere Zellpopulationen steht dieser Beweis noch aus. Bekannt ist aber, dass intrazelluläre n-BP-Aufnahme bei neutrophilen Granulozyten zu einer deutlichen Abschwächung der  $\gamma\delta$ -T-Zell-Expansion führt (Kalyan et al. 2014). Auf diesen Effekt ist die beobachtete mangelnde Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen in Kokultur mit Granulozyten bei Zoledronat-Stimulation vermutlich zurückzuführen. Es ist sogar eine signifikante Unterdrückung der Expansion nachweisbar (Abbildung 4.2). Für die Stimulation mit HMBPP wurde bei Zugabe neutrophiler Granulozyten eine Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen beobachtet, die allerdings deutlich geringer als bei  $CD4^+$  T-Zellen oder Monozyten ausfiel. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zwischen Zoledronat- und HMBPP-Stimulation könnte sein, dass HMBPP extrazellulär bindet und eine Signalkaskade oder eine Konformationsveränderung hervorruft. Während die Vorbehandlung durch Zoledronat bei neutrophilen Granulozyten zu einer Unterdrückung der  $\gamma\delta$  T-Zellen führt, aktiviert HMBPP das Membranmolekül über einen anderen Mechanismus. Die im Vergleich zur Kokultur mit Monozyten geringere Aktivierung ist vermutlich auf eine geringere BTN3A-Oberflächenexpression auf den Granulozyten zurückzuführen (Abbildung

4.3). Weiterführende Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe nach Abschluss der vorliegenden Experimente zeigten in der Tat, dass neutrophile Granulozyten zwar n-BPs aufnehmen, jedoch kein IPP produzieren (Nerdal et al. 2016).

CD4 T-Zellen können nur nach Zugabe löslicher Pyrophosphate wie HMBPP  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Proliferation anregen. Vermutlich führt Zoledronat bei CD4 T-Zellen nicht zur Stimulation von  $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T-Zellen, da ruhende CD4 T-Zellen Zoledronat nicht intrazellulär aufnehmen (Kalyan et al. 2014). Auch der stimulierende Antikörperklon 20.1 führt im Gegensatz zum löslichen Pyrophosphat HMBPP nicht zu  $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T-Zellaktivierung, wenn diese mit CD4 T-Zellen kokultiviert werden. Da  $\alpha\beta$  T-Zellen, von denen CD4 T-Zellen eine Untergruppe darstellen, BTN3A an der Zelloberfläche aufweisen (Abbildung 4.3), ist das ein Indiz dafür, dass der Effekt des Antikörpers nicht nur vom Vorhandensein des Moleküls an der Zelloberfläche, sondern auch von der Zellart abhängt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass verschiedene Populationen umgebender Leukozyten  $\gamma\delta$  T-Zellen BTN3A-abhängig unterschiedlich aktivieren können.

## 5.5. Die Tumorreaktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wird CD277-abhängig beeinflusst.

Das Verständnis des BTN3A1-abhängigen Mechanismus der Präsentation von Pyrophosphaten auf  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen ist Voraussetzung für die Entwicklung von  $\gamma\delta$  T-Zell basierten Tumormimmuntherapien. In vitro ist eindeutig gezeigt, dass  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen sowohl durch Phosphoantigene, als auch durch anti-BTN3A-Antikörper stimuliert werden können. Dabei wurden allerdings nur zwei Aspekte isoliert voneinander betrachtet: Die Reaktion vorstimulierter  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen gegen Tumorzellen (Kapitel 4.1) und die Stimulation sowie die damit verbundene Expansion von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen in Anwesenheit verschiedener Leukozytenpopulationen (Kapitel

4.2). Dabei ist noch zu klären, ob andere Leukozytenpopulationen nicht nur die Proliferation, sondern auch die Tumorreaktivität von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen beeinflussen.

Für  $\gamma\delta$  T-Zellen ist gezeigt worden, dass diese exogene Antigene aufnehmen und HLA Klasse I-abhängig gegenüber  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen kreuzpräsentieren können (Himoudi et al. 2012, Brandes et al. 2005); aber auch, dass  $\gamma\delta$ -T-Zell-defiziente Mäuse eine Hyperaktivität von  $\alpha\beta$  T-Zellen aufweisen, somit  $\gamma\delta$  T-Zellen  $\alpha\beta$  T-Zellen in ihrer Aktivität hemmen (Hayday und Tigelaar 2003). Eine Wechselwirkung von  $\alpha\beta$  T-Zellen mit  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen, als beeinflussbare Größe bei der Tumorbekämpfung wäre somit denkbar, da es deutlich Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen beiden Zellpopulationen gibt. Allerdings scheinen  $\alpha\beta$  T-Zellen bei der Expansion von  $\gamma\delta$  T-Zellen nur bei Zugabe löslicher Pyrophosphate eine Rolle zu spielen (Kapitel 4.2).

Neutrophile Granulozyten können nach vorliegenden Ergebnissen ebenfalls die  $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zell-Proliferation unterstützen, sofern diese mit HMBPP stimuliert werden, wenn auch in deutlich geringerem Maß als es bei  $CD4^+$  T-Zellen der Fall ist. Da für PMBZ, in denen neutrophile Granulozyten nicht vorkommen eine deutliche Proliferation zu erkennen ist, wäre eine zumindest lokale Depletion neutrophiler Granulozyten denkbar, um einen Therapieerfolg zu optimieren.

## 5.6. Einfluss von Zoledronat auf membranständige Expression von BTN3A1

Tumorzellen werden von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen stärker lysiert, wenn diese mit Zoledronat vorbehandelt sind (Harly et al. 2012). Um diese verstärkte Reaktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen näher zu charakterisieren, wurde die Expression von BTN3A-Molekülen auf der Tumoroberfläche sowie der Einfluss von n-BPs näher untersucht. Eine Heraufregulation von Membranmolekülen in Folge von Stimulation ist für B-Zellen am Beispiel von CD86, das zur B7-Molekülfamilie gehört und damit strukturelle Ähnlichkeit zur BTN-Familie besitzt, gezeigt (Shirota et al. 2002).

Im Falle von BTN3A war eine verstärkte Oberflächenexpression allerdings nicht nachweisbar (Abbildung 4.4).

Ein Hinweis auf den möglichen Mechanismus der n-BP-abhängigen  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimulation ist, dass die Fluidität der BTN-Moleküle unter Behandlung mit n-BPs abnimmt (Harly et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings anhand epifokaler Bilder, die mit Imagestream-Durchflusszytometrie gewonnen wurden, keine Unterschiede zwischen n-BP vorbehandelten und unstimulierten Zellen festgestellt werden. Dies muss allerdings nicht bedeuten, dass n-BPs keinen Einfluss auf die Anordnung der BTN3A-Membranmoleküle haben. Es wäre auch möglich, dass sich die Veränderung in der epifokalen Mikroskopie nicht auflösen lässt. Ein anderes Problem bei der Untersuchung der  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T-Zell-spezifischen Aktivierung ist, dass der für die Markierung verwendete Antikörperklon 20.1 nicht spezifisch für die Isoform BTN3A1 ist, die vorrangig die Aktivierung von  $V\delta2$   $\gamma\delta$  T-Zellen induziert. Die anderen ebenfalls markierten Isoformen BTN3A2 und BTN3A3 könnten die Agglomerate des BTN3A1 maskieren. Ferner besteht die Möglichkeit, dass auch nach Fixierung der Tumorzellen durch Formaldehyd die Moleküle innerhalb der Membran noch eine so hohe Mobilität aufweisen, dass – unabhängig von der Stimulation durch Zoledronat –erkennbaren Agglomerate durch die Markierung mit dem für die durchflusszytometrische Untersuchung verwendeten Antikörperklon 20.1 verursacht werden (Abbildung 4.6 A). Dadurch wären eventuelle Veränderungen durch die Zoledronat-Vorbehandlung induziert wurden nicht mehr erkennbar.

Sowohl der stimulierende Antikörperklon 20.1, als auch der inhibitorische 103.2 Antikörperklon sind nicht spezifisch gegen BTN3A1 gerichtet, sondern können auch an die anderen beiden BTN3A-Isoformen binden. Prinzipiell wäre es daher möglich, dass die Granulozyten überwiegend andere Isoformen auf der Oberfläche aufweisen, die nicht zu einer Aktivierung von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T-Zellen führen.

Als eine mögliche Erklärung für n-BP-induzierte Unterschiede bezüglich der  $V\delta2$   $\gamma\delta$  T-Zell Aktivierung wurde in Betracht gezogen, dass BTN3A1 Moleküle infolge einer Stimulation freigesetzt werden könnten. Unter Verwendung eines kommerziellen



BTN3A1-ELISA-Kits ergab sich jedoch - unabhängig von n-BP-Vorbehandlung – bei keiner der verwendeten Tumorzelllinien ein Hinweis auf *shedding* von BTN3A1-Molekülen. Nach Herstellerangaben handelte es sich um ein BTN3A1-spezifisches ELISA-Kit. Da eine Reaktion durch  $\gamma\delta$  T-Zellen auf mit Zoledronat vorbehandelte Tumorzellen schon nach 20 Stunden festgestellt wurde, ist äußerst unwahrscheinlich, dass eine messbare Sekretion von BTN3A1 erst nach längerer Inkubationszeit erfolgen würde. Allerdings kann man anhand dieser Ergebnisse nicht vollständig ausschließen, dass eine Abspaltung des Moleküls von der Zelloberfläche erfolgt, da durch die Abspaltung die Epitope für die verwendeten Antikörper verloren gehen könnten.

## 5.7. Verschiedene Proteine des Zytoskeletts sind mögliche Interaktionspartner von BTN3A1

In dieser Doktorarbeit wurden mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie verschiedene mögliche Bindungspartner von BTN3A1 identifiziert. Mit dem Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) ergibt sich zunächst ein Hinweis, dass BTN3A1 durch Zellstress beeinflusst werden könnte. In einem einmalig durchgeführten Experiment konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass Hitzereize zu einer erhöhten BTN3A-Oberflächenexpression führen. Allerdings bleibt die Möglichkeit einer direkten Interaktion von BTN3A1 mit Stressproteinen denkbar, wie etwa im Zusammenhang mit Autophagie. Dort spielt das Stress-70 Protein eine wichtige Rolle bei der Degradation fehlgefalteter Proteine (Jia et al. 2014). Dort werden fehlgefaltete Proteine über Adapterproteine zu den degradierenden Zellorganellen geleitet. Es wäre denkbar, dass fehlgefaltete Proteine – vermittelt durch Stress-70 Protein - zu einer Veränderung der BTN3A1-Konformation und folglich zu einer Lysereaktion durch  $\gamma\delta$  T-Zellen führen. Zumal das Zytoskelett auch in einem direkten Zusammenhang mit BTN3A1 zu stehen scheint: Auffällig viele identifizierte Proteine stehen im Zusammenhang mit dem Zytoskelett (Drebrin, Vimentin und Alpha-Actinin-4). Ein mögliches Modell wäre, dass BTN3A1 an Proteinen des Zytoskeletts verankert ist. Nach Stimulation könnte es infolge erhöhter IPP-Spiegel zu einer veränderten Interaktion mit diesen Molekülen und einer daraus folgenden

Umverteilung der BTN3A1-Moleküle an der Zelloberfläche kommen. Solche Mechanismen sind bereits für den B-Zell-Rezeptor bekannt. Dort führt eine Erkennung der extrazellulären Struktur dazu, dass die Verankerung der Membranmoleküle am Zytoskelett sich auflöst. Als Folge sind die Transmembranmoleküle beweglicher und sammeln sich in cholesterinreichen „*lipid rafts*“ (Parameswaran et al. 2013). Bei der Aktivierung von  $\gamma\delta$ -T Zellen wurde kürzlich gezeigt, dass das Zytoskelettprotein „Periplakin“ als Mediator einer Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch lösliches HMBPP fungieren kann. Ob auch erhöhte Mengen endogenen IPPs zu einer verstärkten Periplakin-vermittelten V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zell-Aktivierung führen bleibt vorerst unklar, da Rhodes *et al.* diesbezüglich keine eindeutigen Ergebnisse vorlegten (Rhodes et al. 2015) und Periplakin nicht in allen Zellen exprimiert ist, die  $\gamma\delta$  T-Zellen aktivieren.

Auch das ebenfalls mit Hilfe der Immunpräzipitation identifizierte Protein IQGAP1 (*IQ-motif containing Ras-GTPase activating like protein 1*) könnte eine Rolle bei der  $\gamma\delta$  T-Zell-abhängigen Immunantwort spielen. Das Protein ist der Ras GTPase strukturell sehr ähnlich, übt jedoch keine direkte GTPase-Funktion aus. IQGAP1 scheint als Onkogen eine wichtige Rolle zu spielen. Es ist in diversen Tumorzelllinien (Kolorektales Karzinom, Pankreaskarzinom, Glioblastom und Ovarkarzinom) überexprimiert und korreliert mit einer schlechten Prognose. Ferner bindet IQGAP1 auch Rho GTPasen „Rac1“ und „Cdc42“, die ihrerseits Effekte auf das Zytoskelett haben können (Maertens und Cichowski 2014).

IQGAP1 bindet aber auch an Proteine aus dem MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) - oder PI3K/AKT (Phosphoinositid-3-Kinase/Akt)-Signalweg, welche bei Zelldifferenzierung und –proliferation eine Rolle spielen. Das erlaubt die Spekulation, dass die Aktivierung von BTN3A1 durch die Interaktion mit IQGAP1 Einfluss auf die Proliferation ausüben könnte (Maertens und Cichowski 2014). Somit könnte durch IQGAP1 auch das Wachstum oder das Migrationsverhalten in IPP/BTN3A1-abhängiger Weise beeinflusst werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass IQGAP1-Knockout-Mäuse weniger anfällig für eine chemische Tumorinduktion sind (Fujiki et al. 1989). Eine jüngste Publikation könnte den Verdacht einer Beteiligung von IQGAP1 bei der Immunreaktion durch V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen noch erhärten. Dabei wurde

die GTPase RhoB – ein Molekül mit struktureller Ähnlichkeit zu IQGAP1 - als ein Mediator der BTN3A1-abhängigen Immunreaktion vermittelt durch den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TZR identifiziert (Sebestyen et al. 2016). Diese Publikation gibt ferner auch Hinweise auf eine Beteiligung von Proteinen des Zytoskellets, die eine Konformationsveränderung des BTN3A1 induzieren und somit eine Immunreaktion durch V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen initiieren können.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine mögliche Interaktion von Zytoskelett-assoziierten Proteinen mit BTN3A1 hin. Da allerdings auch die Gefahr besteht, bei der Immunpräzipitation von membranassoziierten Molekülen unspezifisch Moleküle des Zytoskellets zu präzipitieren, müssen die identifizierten Bindungspartner aber zunächst in weiterführenden Experimenten bestätigt werden, bevor deren Funktionen bei der V $\delta$ 2 T-Zell Aktivierung im Weiteren untersucht werden können. Interessanterweise wurden in der vorliegenden Arbeit andere Vertreter ähnlicher Proteinfamilienmitglieder identifiziert wie von Rhodes und Kollegen berichtet (Rhodes et al. 2014). Das BTN3A1-Interaktom und damit die Klärung der Frage, wie BTN3A1 die  $\gamma\delta$  T-Zell-Aktivierung steuert ist damit jedoch noch nicht abschließend geklärt.

## 5.8. Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Expansion von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen vor allem durch Monozyten, aber auch stimulusabhängig von  $CD4^+$  T-Zellen und sogar von neutrophilen Granulozyten gefördert werden kann. Die Reaktion von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen auf Tumorzellen ist infolge aller drei Stimuli (BrHPP, Zoledronat oder ant-BTN3A 20.1) vorhanden, wie es anhand der Oberflächentranslokation des lysosomalen Proteins LAMP-1 nachweisbar war. Zu untersuchen bleibt, ob die isolierte Anwesenheit von Monozyten,  $CD4^+$  T-Zellen oder neutrophilen Granulozyten Einfluss auf Tumorreaktivität von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen nimmt, um dann den Einsatz, von  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen – beispielweise unter Einbeziehung des Antikörperklon 20.1 – *in vivo* auszutesten. Dazu könnten selektiv Isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen mit verschiedenen Leukozytenpopulationen und Tumorzellen kokultiviert werden. Die Tumoraktivität der  $\gamma\delta$  T-Zellen könnte, wie in den bisherigen Experimenten, anhand des lysosomalen Proteins LAMP1 evaluiert werden.

Ferner konnten diverse potentielle Bindungspartner an BTN3A1 identifiziert werden. Diese müssen zunächst durch weitere Experimente bestätigt werden und dann auf deren Rolle beim Tumorbekämpfungsprozess der  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen untersucht werden. Beispielsweise können selektiv Proteine durch siRNA deaktiviert und Veränderungen in der  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zell-Funktion beobachtet werden. Die neu aufgeklärten Mechanismen können dann für die Entwicklung neuer Immuntherapien gegen Tumoren verwendet werden.

## 6. Zusammenfassung

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen erkennen Pyrophosphate, von Bakterien oder Parasiten, wie das 4-hydroxy-but-2-enyl-Pyrophosphat (HMBPP) und in hohen Konzentrationen auch das endogene Isopentenylpyrophosphat (IPP). Solche Konzentrationen können bei Tumorzellen erreicht und durch Gabe von Aminobisphosphonaten (n-BPs) zusätzlich gesteigert werden. Diese Immunreaktion setzt das Membranmolekül Butyrophillin 3A1 (BTN3A1) voraus. Unverstanden ist, wie V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen vermittelt durch BTN3A1 Pyrophosphate erkennen, was in dieser Doktorarbeit näher charakterisiert werden sollte.

Dabei konnte bestätigt werden, dass Pyrophosphate (IPP und HMBPP) zu einer stärkeren Reaktion von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen auf Tumorzellen führen. Auch der Einfluss von anti-BTN3A-Antikörpern auf die Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte reproduziert werden. Durch den Antikörperklon 20.1 konnte eine Aktivierung erzielt, der Antikörper 103.2 konnte eine Aktivierung durch n-BPs aufheben. Die Rolle anderer Leukozytenpopulationen auf die Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen (durch Antikörper oder Phosphoantigene) wurde genauer untersucht. Es wurde festgestellt, dass auch  $\alpha\beta$  T-Helferzellen die Proliferation von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T- mit Hilfe des anti-BTN3A-Antikörperklon 20.1 oder HMBPP induzieren. Die Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen durch n-BPs war nur in Anwesenheit von Monozyten möglich. Um zu klären über welchen Mechanismus  $\gamma\delta$  T-Zellen Tumorzellen bekämpfen, konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Tumorzellen mit n-BPs (und die damit vermutlich einhergehende Erhöhung des intrazellulären IPP-Spiegels), nicht zu einer veränderten Oberflächenexpression von BTN3A führt. Auch ein Einfluss auf die Verteilung von BTN3A Molekülen auf der Tumorzelloberfläche ließ sich epifokal nicht nachweisen. Eine Freisetzung von BTN3A1 in den Extrazellulärraum konnte durch einen BTN3A1-ELISA nahezu ausgeschlossen werden. Somit ist naheliegend, dass intrazelluläre Prozesse entscheidend für die BTN3A-abhängige Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen sind. In dieser Arbeit wurden ferner potentielle Bindungsproteine von BTN3A1 durch Massenspektrometrie identifiziert und hierbei vor allem zytoskelettassoziierte Proteine identifiziert. Möglicherweise führt die Stimulation von

Zielzellen mit Pyrophosphaten zu einer veränderten Membranverankerung von BTN3A1. Der hier vermutete Einfluss des Zytoskeletts bei der Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen und die unterschiedliche Rolle der umgebenden Leukozyten-Populationen stellen neue Ansatzpunkte zur Entwicklung von Tumor-Immuntherapien mit Hilfe von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen dar.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Muto, M., Nieda, M., Nakagawa, Y., Nicol, A., Kaneko, T., Goto, S., Yokokawa, K., Suzuki, K. (2009): Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V $\gamma$ 9  $\gamma\delta$  T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp. Hemat.*, 37, 956–968.
- Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J., Jenkinson, E. J. (1996): Cellular interactions in thymocyte development. *Ann. Rev. Immunol.*, 14, 73–99.
- Belizario, J. E., Brandao, W., Rossato, C., Peron, J. P. (2016): Thymic and postthymic regulation of naive CD4(+) t-Cell lineage lates in humans and mice models. *Mediators Inflamm.*, 2016:9523628.
- Von Boehmer, H., Aifantis, I., Feinberg, J., Lechner, O., Saint-Ruf, C., Walter, U. (1999): Pleiotropic changes controlled by the pre-t-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 135–142.
- Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., Grassi, F., von Boehmer, H. von (2002): On the brink of becoming a t cell. *Curr. Opin. Immunol.*, 14, 200–206.
- Brandes, M., Willimann, K., Moser, B. (2005): Professional antigen-presentation function by human  $\gamma\delta$  T Cells. *Science*, 309, 264–268.
- Chandasekaran, V., Kalyan, S., Biel, V., Lettau, M., Nerdal, P. T., Oberg, H.-H., Wesch, D., Lindhorst, T. K., Kabelitz, D. (2015): Novel synthesis of fluorochrome-coupled zoledronate with preserved functional activity on gamma/delta t cells and tumor cells. *Med. Chem. Commun.*, 6, 919-925.
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Orekhov, Alexander N. (2015): Neutrophil's weapons in atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.*, 99, 663–671.
- Chiplunkar, S., Dhar, S., Wesch, D., Kabelitz, D. (2009):  $\gamma\delta$  t cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy*, 1, 663–678.
- Compte, E., Pontarotti, P., Collette, Y., Lopez, M., Olive, D. (2004): Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur. J. Immunol.*, 34, 2089–2099.
- Cubillos-Ruiz, J. R., Martinez, D., Scarlett, U. K., Rutkowski, M. R., Nesbeth, Y. C., Camposeco-Jacobs, A. L., Conejo-Garcia, J. R. (2010): CD277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells. *Oncotarget*, 1, 329–338.
- Davies, A. J., Leuchars, E., Wallis, V., Koller, P. C. (1966): The mitotic response of thymus-derived cells to antigenic stimulus. *Transplantation*, 4, 438–451.
- D’Cruz, A. A., Kershaw, N. J., Chiang, J. J., Wang, M. K., Nicola, N. A., Babon, J. J., Gack, M. U., Nicholson, S. E. (2013): Crystal structure of the TRIM25 B30.2 (PRYSPRY) domain: a key component of antiviral signalling. *Biochem. J.*, 456, 231–240.
- Dieli, F., Vermijlen, D., Fulfaro, F., Caccamo, N., Meraviglia, S., Cicero, G., Roberts, A., Buccheri, S., D’Asaro, M., Gebbia, N., Salerno, A., Eberl, M., Hayday, A. C. (2007): Targeting human  $\gamma\delta$  T cells with zoledronate and interleukin-2 for

- immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.*, 67, 7450–7457.
- Distler, J. J., Jourdian, G. W. (1973): The purification and properties of beta-galactosidase from bovine testes. *J. Biol. Chem.*, 248, 6772–6780.
- Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., von Boehmer, H. (1995): Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature*, 375, 795–798.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Kanazawa, H., Sugimura, T., Manam, S., Kahn, S. M., Jiang, W., Hoshina, S., Weinstein, I. B. (1989). Codon 61 mutations in the c-Harvey-ras gene in mouse skin tumors induced by 7,12-dimethylbenzaanthracene plus okadaic acid class tumor promoters. *Mol. Carcinog.*, 2, 184–187.
- Gober, H.-J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., De Libero, G. (2003): Human T cell receptor  $\gamma\delta$  cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.*, 197, 163-168.
- Goldrath, A. W., Bevan, M. J. (1999): Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402, 255–262.
- Hannani, D., Yuting, M., Takahiro, Y., Déchanet-Merville, J., Kroemer, G., Zitvogel, L. (2012): Harnessing  $\gamma\delta$  t cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol.*, 33, 5, 199-206.
- Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.-M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E. J., Netzer, S., Déchanet-Merville, J., Léger, A., Herrmann, T., Breathnach, R., Olive, D., Bonneville, M., Scotet, E. (2012): Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset. *Blood*, 120, 2269–2279.
- Hayday, A. C., Barber, D. F., Douglas, N., Hoffman, E. S. (1999): Signals involved in  $\gamma\delta$  T cell versus  $\alpha/\beta$  T cell lineage commitment. *Semin. Immunol.*, 11, 239–249.
- Hayday, A., Tigelaar, R. (2003): Immunoregulation in the tissues by  $\gamma\delta$  T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 233–242.
- Himoudi, N., Morgenstern, D. A., Yan, M., Vernay, B., Saraiva, L., Wu, Y., Cohen, C. J., Gustafsson, K., Anderson, J. (2012): Human  $\gamma\delta$  T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J. Immunol.*, 188, 1708–1716.
- Hollán, S. (1990): How T cells talk to target cells. *Haematologia*, 23, 129–144.
- Holubec, L., Polivka, J., Safanda, M., Karas, M., Liska, V. (2016): The role of cetuximab in the induction of anticancer immune response in colorectal cancer treatment. *Anticancer Res.*, 36, 4421-4426.
- Jia, B., Wu, Y., Zhou, Y. (2014): 14-3-3 and aggresome formation: implications in neurodegenerative diseases. *Prion*, 8., 173-177.
- Kabelitz, D., Bender, A., Schondelmaier, S., da Silva Lobo, M. L., Janssen, O. (1990): Human cytotoxic lymphocytes. V. frequency and specificity of gamma delta+ cytotoxic lymphocyte precursors activated by allogenic or autologous stimulator cells. *J. Immunol.*, 145, 2827-2832.
- Kabelitz, D., Kalyan, S., Oberg, H.-H., Wesch, D. (2013): Human V $\delta$ 2 versus non-V $\delta$ 2



- $\gamma\delta$  T cells in antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 2, e23304.
- Kabelitz, D., Marischen, L., Oberg, H.-H., Holtmeier, W., Wesch, D. (2005): Epithelial defence by  $\gamma\delta$  T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 137, 73–81.
- Kalyan, S., Chandrasekaran, V., Quabius, E. S., Lindhorst, T. K., Kabelitz, D. (2014): Neutrophil uptake of nitrogen-bisphosphonates leads to the suppression of human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71, 2335–2346.
- Kim, Y.-D., Kwon, M.-S., Na, B.-R., Kim, H.-R., Lee, H.-S., Jun, C.-D. (2013): Swiprosin-1 Expression is Up-Regulated through Protein Kinase C-theta and NF- $\kappa$ B Pathway in T Cells. *Immune Netw.*, 13, 55–62.
- Kobayashi, H., Tanaka, Y., Yagi, J., Minato, N., Tanabe, K. (2011): Phase I/II study of adoptive transfer of  $\gamma\delta$  T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 60, 1075–1084.
- Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe, A. I., von Boehmer, H. (2010): ab versus gd fate choice: counting the T-cell lineages at the branch point. *Immunol. Rev.*, 238, 169–181.
- Maertens, O., Cichowski, K. (2014): An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Adv. Biol. Regul.*, 55, 1–14.
- Messal, N., Mamessier, E., Sylain, A., Celis-Gutierrez, J., Thibult, M.-L., Chetaille, B., Firaguay, G., Pastor, S., Guillaume, Y., Wang, Q., Hirsch, I., Nunès, J. A., Olive, D. (2011): Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 41, 3443–3454.
- Miltenyi, S.; Muller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231–238.
- Miyagawa, F., Tanaka, Y., Yamashita, S., Minato, N. (2001): Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta t cells by aminobisphosphonate antigen. *J. Immunol.*, 166, 5508–5514.
- Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B. R., Golan, D. E., Brenner, M. B. (1995): Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity*, 3, 495–507.
- Morita, C. T., Lee, H. K., Wang, H., Li, H., Mariuzza, R. A., Tanaka, Y. (2001): Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. *J. Immunol.*, 167, 36–41.
- Mottok, A., Steidl, C. (2015): Genomic alterations underlying immune privilege in malignant lymphomas. *Curr. Opin. Hematol.*, 22, 343–354.
- Murphy, K. M., Reiner, S. L. (2002): The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 933–944.
- Murphy, M. E. (2013): The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34, 1181–1188.
- Murphy, K. (2012): *Janeway's immunobiology 8<sup>th</sup> edition*, Garland Science, USA.
- Nerdal, P. T., Peters, C., Oberg, H.-H., Zlatev, H., Lettau, M., Quabius, E. S., Sousa, S., Gonnermann, D., Auriola, S., Olive, D., Määttä, J., Janssen, O., Kabelitz, D. (2016): Butyrophilin 3A/CD277-dependent activation of human  $\gamma\delta$  T cells: Accessory

- cell capacity of distinct leukocyte populations. *J. Immunol.*, 197, 3059-3068.
- Ni, M., Zhang, Y., Lee, A. S. (2011): Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem. J.*, 434, 181–188.
- Nussbaumer, O., Gruenbacher, G., Gander, H., Komuczki, J., Rahm, A., Thurnher, M. (2013): Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and  $\gamma\delta$  T cell proliferative responses. *J. Immunol.*, 191, 1346–1355.
- Pereira, P., Boucontet, L., Cumano, A. (2012): Temporal predisposition to  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell fates in the thymus. *J. Immunol.*, 188, 1600–1608.
- Petrie, H. T., Livak, F., Burtrum, D., Mazel, S. (1995): T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J. Exp. Med.*, 182, 121–127.
- Riaño, F., Karunakaran, M. M., Starick, L., Li, J., Scholz, C. J., Kunzmann, V., Olive, D., Amslinger, S., Herrmann, T. (2014):  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6. *Eur. J. Immunol.*, 44, 2571–2576.
- Roelofs, A. J., Jauhainen, M., Mönkkönen, H., Rogers, M. J., Mönkkönen, J., Thompson, K. (2009): Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br. J. Haematol.*, 144, 245-250.
- Rhodes, D. A., Chen, H. C., Price, A. J., Keeble, A. H., Davey, M. S., James, L. C., Eberl, M., Trowsdale, J. (2015): Activation of human  $\gamma\delta$  t cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin. *J. Immunol.*, 194, 2390-2398.
- Thompson, K. (2009): Peripheral blood monocytes are responsible for  $\gamma\delta$  T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br. J. Hematol.*, 144, 245–250.
- Sandstrom, A., Peigné, C. M., Léger, A., Crooks, J. E., Konczak, F., Gesnel, M. C., Breathnach, R., Bonneville, R., Scotet, E., Adams, E. J. (2014): The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells. *Immunity*, 40, 490-500.
- Sebestyen, Z., Scheper, W., Vyborova, A., Gu, S., Rychnavska, Z., Schiffler, M., Cleven, A., Chéneau, C., van Noorden, M., Peigné, C.-M., Olive, D. (2016): RhoB mediates phosphoantigen recognition by  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell receptor. *Cell Rep.*, 15, 1973-1985.
- Sengupta, N., MacFie, T. S., MacDonald, T. T., Pennington, D., Silver, A. R. (2010): Cancer immunoediting and “spontaneous” tumor regression. *Pathol. Res. Pract.*, 206, 1–8.
- Shekhar, S., Pernier, J., Carlier, M.-F. (2016): Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *J. Cell. Sci.*, 129, 1085–1091.
- Shi, A.-M., Tao, Z.-Q., Li, R., Wang, Y.-Q., Wang, X., Zhao, J. (2016): Vimentin and post-translational modifications in cell motility during cancer - a review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 20, 2603–2606.
- Shirota, H., Sano, K., Hirasawa, N., Terui, T., Ohuchi, K., Hattori, T., Tamura, G.

(2002): B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J. Immunol.*, 169, 787–794.

Stiburek, L., Fornuskova, D., Wenchich, L., Pejznochova, M., Hansikova, H., Zeman, J. (2007): Knockdown of human Oxa1l impairs the biogenesis of F1Fo-ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Mol. Biol.*, 374, 506–516.

Thompson, K., Roelofs, A. J., Jauhiainen, M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Rogers, M. J. (2010): Activation of  $\gamma\delta$  T cells by bisphosphonates. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 658, 11–20.

Thompson, K., Rogers, M. J. (2003): Statins prevent bisphosphonate-induced  $\gamma,\delta$ -T-cell proliferation and activation in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 19, 278-288.

Tiel Groenestege, W. M., Thébault, S., van der Wijst, J., van den Berg, D., Janssen, R., Tejpar, S., van den Heuvel, L. P., van Cutsem, E., Hoenderop, J. G., Knoers, N. V., Bindels, R. J. (2007): Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes recessive renal hypomagnesemia. *J. Clin. Invest.*, 117, 2260-2267.

Toor, A. A., Toor, A., Rahmani, M., Manjili, M. H. (2016): On the organization of human T-cell receptor loci: log-periodic distribution of T-cell receptor gene segments. *J. R. Soc. Interface*, 13, 20150911.

Tourigny, M. R., Mazel, S., Burtrum, D. B., Petrie, H. T. (1997): T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J. Exp. Med.*, 185, 1549–1556.

Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G. S., Ramanjaneyulu, G. S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N. K., Gostick E., Price, D. A., Soudamini, D. U., Voon K. K., Olivo, M., Rossjohn J., Mori, L., De Libero, G. (2013): Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human  $\gamma\delta$  T cells. *Nat. Immunol.*, 14, 908–916.

Verrier, F., Mignotte, B., Jan, G., Brenner, C. (2003): Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1010, 126–142.

Wang, H., Morita, C. T. (2015): Sensor function for butyrophilin 3a1 in prenyl pyrophosphate stimulation of human  $v\gamma9v\delta2$  t cells. *J. Immunol.*, 195, 4583-4594.

Waskow, C., Rodewald, H.-R. (2002): Lymphocyte development in neonatal and adult c-Kit-deficient (c-Kit<sup>W/W</sup>) mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 512, 1–10.

Wu, L., Kincade, P. W., Shortman, K. (1993): The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate. *Immunol. Lett.*, 38, 69–75.

Yahata, T., de Caestecker, M. P., Lechleider, R. J., Andriole, S., Roberts, A. B., Isselbacher, K. J., Shioda, T. (2000): The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 275, 8825–8834.

Zhang, R., Zhang, C. Y., Zhao, Q., Li, D. H. (2013): Spectrin: structure, function and disease. *Sci. China Life Sci.*, 56, 1076–1085.

## 8. Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kabelitz für die Möglichkeit diese Doktorarbeit zu machen, für das Thema der Arbeit und die geduldige Betreuung. Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Schütze und ganz besonders bei Herrn Prof. Janssen für die Betreuung der biochemischen Arbeiten in dieser Arbeit. Auch Herrn Dr. Fritsch danke ich für die Betreuung der Arbeiten an der Imagestream-Durchflusszytometrie und biochemischer Arbeiten. Ich danke Dr. Peters und Daniel Gonnermann für die vielen Hilfen im Labor und beim Zusammenschreiben der Doktorarbeit. Ein großer Dank gilt auch Dr. Chitadze, Dr. Fazio, Dr. Lettau, Jaydeep Bhat, Monika Kunz, Sandra Ussat, Hoa Ly und Melanie Nebendahl für die Unterstützung bei der Laborarbeit. Für die Einarbeitung in die Labormethoden danke ich auch Prof. Wesch und PD Dr. Oberg. Ich bedanke mich bei der medizinischen Fakultät für die finanzielle Förderung meiner Doktorarbeit und für die Auszeichnung mit dem Förderpreis der medizinischen Fakultät. Ich danke auch allen anderen Menschen, die mich in der Fertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben und den Blutspendern. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre große Unterstützung bei der Doktorarbeit, aber auch über mein ganzes Studium.

## 9. Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit

**Nerdal, P. T.**, Peters, C., Oberg, H.-H., Zlatev, H., Lettau, M., Quabius, E. S., Sousa, S., Gonnermann, D., Auriola, S., Olive, D., Määttä, J., Janssen, O., Kabelitz, D. (2016): Butyrophilin 3A/CD277-dependent activation of human  $\gamma\delta$  T cells: Accessory cell capacity of distinct leukocyte populations. *J. Immunol.*, 197, 3059-3068.

Chandasekaran, V., Kalyan, S., Biel, V., Lettau, M., **Nerdal, P. T.**, Oberg, H.-H., Wesch, D., Lindhorst, T. K., Kabelitz, D. (2015): Novel synthesis of fluorochrome-coupled zoledronate with preserved functional activity on gamma/delta t cells and tumor cells. *Med. Chem. Commun.*, 6, 919-925.

Poster vom DGFI- Kongress 2014:

**Nerdal, T.**, Fritsch, J., Chitadze, G., Peters, C., Oberg, H.-H., Wesch, D., Schütze, S., Janssen, O., Kabelitz, D.: Involvement of butyrophilin 3A1 in the activation of human  $\gamma\delta$  T cells by pyrophosphates.