

Aus dem Institut für Immunologie

(Direktor: Prof. Dr. A. Scheffold)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss von Indolamin-2,3-Dioxygenase auf die  
 $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse von duktalem  
Adenokarzinom des Pankreas**

Inauguraldissertation zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Hannah Jonescheit

aus Hamburg

Kiel 2018

1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. Wesch

2. Berichterstatter/in: Herr Prof. Dr. Arnold

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.10.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DUKTALES PANKREAS ADENOKARZINOM</b>	<b>1</b>
1.1.1 MIKROUMGEBUNG DES PDAC	2
<b>1.2 IMMUNSYSTEM</b>	<b>3</b>
1.2.1 T-LYMPHOZYTEN	4
1.2.2 $\gamma\delta$ T-LYMPHOZYTEN	6
<b>1.3 ASPEKTE DER IMMUNTHERAPIE</b>	<b>9</b>
1.3.1 $\gamma\delta$ T-ZELLABWEHR GEGENÜBER TUMOREN	9
1.3.2 BISPEZIFISCHE ANTIKÖRPER	10
<b>1.4 IMMUNE ESCAPE MECHANISMEN VON PDAC</b>	<b>12</b>
1.4.1 INDOLAMIN-2,3-DIOXYGENASE	13
<b>2. FRAGESTELLUNG</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>3.1 MATERIALIEN</b>	<b>17</b>
3.1.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	17
3.1.2 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	19
3.1.3 ZYTOKINE UND ANDERE STIMULANZIEN	21
3.1.4 ANTIKÖRPER	22
3.1.4.1 Monoklonale Antikörper für Oberflächenfärbungen	22
3.1.4.2 Monoklonale Antikörper für intrazelluläre Färbungen	23
3.1.4.3 Antikörper für Westernblot	23
3.1.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
3.1.6 ZELLINIEN	24
3.1.7 GERÄTE	25
3.1.8 SOFTWARE	26
3.1.9 STATISTIK	26
<b>3.2 METHODEN</b>	<b>27</b>
3.2.1 ZELLKULTUR	27
3.2.1.1 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen	27
3.2.1.2 Zellquantifizierung und Zellvitalität	27
3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen	28
3.2.1.4 Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien	28
3.2.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	29
3.2.2.1 Markierung von Oberflächenantigenen	30

3.2.2.2 Markierung von intrazellulären Proteinen	30
3.2.2.3 Propidiumiodid Färbung	31
3.2.2.4 Degranulierungstest	31
3.2.3 REAL-TIME-CELL-ANALYZER	32
3.2.4 WESTERN BLOT ANALYSE	33
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>4.1 SENSITIVITÄTEN EINZELNER PDAC ZELLINIEN FÜR DIE <math>\gamma\delta</math> T-ZELL VERMITTELTE LYSE</b>	<b>36</b>
<b>4.2 INTRAZELLULÄRE IDO EXPRESSION</b>	<b>38</b>
4.2.1 EXPRESSION IN PDAC ZELLEN	38
4.2.2 IDO EXPRESSION IN PDAC ZELLEN NACH STIMULATION MIT IFN- $\gamma$	40
4.2.3 IDO EXPRESSION IN $\gamma\delta$ T-ZELLEN	42
<b>4.3 BEHANDLUNG DER PDAC ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN IDO INHIBITOREN</b>	<b>43</b>
4.3.1 EINFLUSS DER IDO INHIBITOREN AUF DEN ZELLTOD VON PDAC- UND $\gamma\delta$ T-ZELLEN	43
4.3.2 MÖGLICHE BEEINFLUSSUNG DES ZELLWACHSTUMS DURCH IDO INHIBITOREN	47
4.3.3 VERÄNDERUNG DER $\gamma\delta$ T-ZELL VERMITTELTEN LYSE EINZELNER PDAC ZELLEN	50
<b>4.4 BEHANDLUNG MIT IDO ZWISCHENPRODUKTEN</b>	<b>53</b>
4.4.1 EINFLUSS VON IDO ZWISCHENPRODUKTEN AUF DEN ZELLTOD	53
4.4.2 BEEINFLUSSUNG DER $\gamma\delta$ T-ZELL VERMITTELTEN LYSE EINZELNER PDAC ZELLEN DURCH METABOLITE DES TRYPTOPHAN KATABOLISMUS	54
<b>4.5 EINFLUSS VON IDO STOFFWECHSELPRODUKTEN AUF DIE DEGRANULATION VON <math>\gamma\delta</math> T-ZELLEN</b>	<b>58</b>
4.5.1 EFFEKTE VON IDO INHIBITOREN AUF DIE DEGRANULATION VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN	58
4.5.2 EFFEKTE VON IDO ZWISCHENPRODUKTEN AUF DIE DEGRANULATION VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN	60
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>5.1 EINFLUSS DER IDO EXPRESSION AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT VON <math>\gamma\delta</math> T-ZELLEN</b>	<b>63</b>
<b>5.2 ÜBERWINDUNG DER IDO VERMITTELTEN RESISTENZ-MECHANISMEN EINER LYSE DURCH <math>\gamma\delta</math> T-ZELLEN</b>	<b>67</b>
<b>5.3 AUSBLICKE</b>	<b>70</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>8. PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>90</b>
<b>9. ERKLÄRUNG</b>	<b>91</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>92</b>

# Abkürzungsverzeichnis

1-D/L-MT	1-Methyl-Dextro/Levo-Tryptophan
AF647	Alexa Fluor® 647
AHR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
Ak, bsAk, mAk	Antikörper, bispezifischer Ak, monoklonaler Ak
APC	Allophycocyanin
AZT	adoptiver Zelltransfer
BrHPP	Bromohydrinpyrophosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
COX2	Cyclooxygenase 2
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4 (CD152)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dnPs	Tag nach Primärstimulation
Dup697	<i>5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-methylsulfonylphenyl)thiophene</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E/T Ratio	Effektor:Zielzell Verhältnis
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellseparation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FoxP3	<i>forkhead box protein P3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN-2	<i>general control non-derepressible 2</i>
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HLA	humanes Leukozyten Antigen

HMB-PP	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphat
IDO1/2	Indolamin-2,3-Dioxygenase 1/2
IFN	Interferon
IPP	Isopentenylpyrophosphat
LAMP-1	Lysosomen assoziiertes Membranprotein (CD107a)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
n-BP	Aminobisphosphonate
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAg	Phosphoantigen
PBMZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI	Propidiumiodid
POD	Meerrettichperoxidase
RTCA	Real-Time-Cell-Analyzer (xCELLigence System)
SDS	Natriumlaurylsulfat
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
Tregs	regulatorische T-Zellen
TUZ	Tumorzellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

# 1. Einleitung

## 1.1 Duktales Pankreas Adenokarzinom

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist einer der häufigsten Pankreastumore mit einer extrem aggressiven Malignität. Symptome manifestieren sich oft erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, sodass die chirurgischen Therapiemöglichkeiten zum Zeitpunkt der Diagnose eingeschränkt, häufig Resistenzen gegenüber Chemo- und Radiotherapie vorhanden und die verbleibenden Lebenserwartungen der Patienten gering sind (Ujiki et al. 2005; Ilic et al. 2016). Die 5-Jahres Überlebensrate der Pankreaskarzinompatienten betrug in den USA in den Jahren von 2006 bis 2012 etwa 8 %, betrachtet man nur die der fortgeschrittenen Stadien so betrug sie 3 %. Verglichen mit anderen Entitäten ist die Inzidenz der Pankreaskarzinome gering, ihre Aggressivität macht sie jedoch in den USA wie auch in Deutschland zur viert häufigsten krebsbedingten Todesursache (Siegel et al. 2017; Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015). 20 % der Patienten sind neben der Radio- und Chemotherapie auch für eine operative Therapie geeignet, bei einem Großteil dieser Patienten beobachtet man allerdings perioperative Komplikationen und Rezidive (Ujiki et al. 2005; Neoptolemos et al. 2004; D'Haese et al. 2016).

Der therapeutische Erfolg bei PDAC Patienten ist so gering, dass in den letzten Jahren fortlaufend neue Ansätze für eine frühzeitigere Diagnostizierung und zur besseren Kontrolle des Krankheitsverlaufs entwickelt worden sind. Unter anderem wurden Studien zur Identifizierung und Bewertung verschiedener Biomarker wie CA 19-9, CEA oder ganzer Serum *Panel* durchgeführt, Profile karzinomspezifischer microRNA erstellt oder zirkulierende Tumorzellen (TUZ) des epithelialen oder mesenchymalen Phänotyps bewertet (Poruk et al. 2013; Gerdtsen et al. 2016; Vila-Navarro et al. 2017; Poruk et al. 2016). Ältere Studien mit Biomarkern zeigten jedoch keinen Erfolg hinsichtlich ihrer Spezifität und Eignung für *Screening* Verfahren, sodass in den letzten 30 Jahren keine signifikante Verringerung der

Mortalität des Pankreaskarzinoms festgestellt werden konnte (Bosetti et al. 2013). Neben einer Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie besitzt das PDAC ein desmoplastisches Tumorstroma, durch welches das Pankreaskarzinom eine Immunantwort zytotoxischer T-Zellen weitestgehend verhindert (Kleeff et al. 2007). Zelluläre Bestandteile dieses Stromas sind neben Tumor assoziierten Makrophagen, regulatorischen T-Zellen (Tregs) und myeloiden Suppressorzellen auch multipotente mesenchymale Stammzellen und differenzierte Zellen mesenchymalen Ursprungs (z.B. Fibroblasten und Pankreassternzellen) (Neesse et al. 2015). Eine Modulation des Immunsystems und der Mikroumgebung des Tumors stellt eine neue alternative Therapiemöglichkeit des Pankreaskarzinoms dar und ist Gegenstand der Forschung der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wesch und Herrn PD Dr. Oberg.

### **1.1.1 Mikroumgebung des PDAC**

Die Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms (*tumor microenvironment*, TME) birgt eine Vielzahl typischer Merkmale und wird als eine Ursache des Scheiterns systemischer Therapien in Betracht gezogen. Charakteristisch ist die Zunahme immunsuppressiver Zellen wie Tumor assoziierter Makrophagen und regulatorischer T-Zellen in Verbindung mit einer verminderten Immunantwort zytotoxischer Lymphozyten im Umfeld des Tumors (Neesse et al. 2015; Oberg et al. 2016; Helm et al. 2014). Hierbei korreliert die Stärke des Rückgangs der Immunantwort mit dem Progress der Krankheit und der Verschlechterung der Prognose (Ino et al. 2013). Mutationen des ras Protoonkogens sind bereits in PanIN 1 Präkanzerosen zu finden und treten in > 90 % der PDAC auf, assoziiert auch mit einer Inaktivierung der Tumorsuppressorgene Ink4a, SMAD4 und p53 (Morris et al. 2010). Betrachtet man die daraus entstehenden Dysplasien, resultiert die Festigkeit der extrazellulären Matrix aus der Anhäufung von Kollagenen, Fibronektin, Proteoglykanen und Hyaluronsäure inmitten von Tumorzellen, Fibroblasten und Immunzellen sowie löslicher Wachstumsfaktoren wie *connective tissue growth factor* (CTGF) und *platelet derived endothelial growth factor* (PDGF). Die TME führt unter anderem zu einer Verdrängung der normalen Vaskularisation des umliegenden Gewebes, verhindert eine effektive Immunantwort und stellt eine



physikalische Barriere für Chemotherapeutika dar (Neesse et al. 2015; Feig et al. 2012; Sato et al. 2016).

## 1.2 Immunsystem

Zum einen ist der Mensch pathogenen Erregern wie Bakterien, Viren und Parasiten aus seiner Umwelt ausgeliefert, zum anderen krankmachenden genetischen Prädispositionen und entarteten Mechanismen des eigenen Körpers, wie es zum Beispiel bei einem Karzinom der Fall ist. Aufgabe des Immunsystems ist das Erkennen, die Verteidigung gegen und Abwehr der „Gefahren“. Die Reifung immunkompetenter Zellen erfolgt in primär lymphatischen Organen, wie dem Thymus und dem Knochenmark, die Entstehung der Immunantwort hingegen in den Proliferationszonen der sekundären lymphatischen Organe. Essentiell ist hierbei die Fähigkeit des Immunsystems zwischen dem „Selbst“ und „Fremd“ differenzieren zu können.

Man unterscheidet zwischen dem angeborenen (*innate*) und dem erworbenen (*adaptive*) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem basiert unter anderem auf Keimbahn kodierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) und stellt die erste unspezifische Abwehrreaktion des Körpers auf eine Infektionen dar. Es kann eine Reihe von Effektormechanismen induzieren. Dazu zählen humorale Mechanismen wie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine oder die Aktivierung des Komplementsystems, genauso wie die Beteiligung zellulärer Komponenten wie Granulozyten, natürlichen Killerzellen und Antigen-präsentierenden Zellen wie den Makrophagen und den dendritische Zellen als Teil der angeborenen Immunantwort, die zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems führen kann. Dieses setzt sich aus B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) zusammen. Charakteristisch für das adaptive Immunsystem ist eine Antigen-spezifische Antwort auf eine Infektion und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Effektivität dieses Systems basiert auf dem Prinzip der klonalen Selektion, d.h. der Proliferation und Differenzierung aktivierter Lymphozyten zu klonalen Effektorzellen und der Toleranz gegenüber Autoantigenen. Während B-Zellen Antikörper produzieren und

so die humorale Immunantwort unterstützen, sind T-Zellen Teil der zellulären Immunabwehr des erworbenen Immunsystems (Murphy et al. 2014).

### 1.2.1 T-Lymphozyten

Nach ihrer Entstehung im Knochenmark reifen T-Lymphozyten im Thymus heran. Die somatische Rekombination der V (Variabilität), D (Diversität) und J (Joining) Gensegmente des T-Zell-Rezeptors (TZR) bedingt hierbei die Vielfalt und Antigen-spezifität des TZR (Schatz 2004). Mit Abschluss ihrer Entwicklung sind die Lymphozyten mit Hilfe des TZR in der Lage Fremdan-tigene zu erkennen. Abhängig von dem jeweiligen TZR werden diese Fremdan-tigene dabei mehrheitlich über Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) Moleküle präsentiert. Das zentrale Element des TZR bilden membranständige  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  Heterodimere, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Sie besitzen extrazellulär eine Antigen bindende variable (V) sowie eine konstante (C) Region, eine die Lipiddoppelschicht durchdringende Transmembrandomäne und den C-terminalen Bereich im Zytoplasma. Der TZR ist charakteristischerweise nicht kovalent mit den  $\gamma$ -,  $\delta$ -, sowie zwei  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -Ketten des *cluster of differentiation* Komplex 3 (CD3) assoziiert, einem Korezeptor der Antigenerkennung mit Bedeutung für die Signaltransduktion. Sowohl funktionell als auch anhand ihrer CD-Oberflächenmoleküle lassen sich die T-Lymphozyten weiter unterteilen (Golubovskaya et al. 2016; Dempke et al. 2017).  $CD4^+$  T-Helferzellen ( $T_H$ ) erkennen Antigene über MHC II Moleküle auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Funktionen anderer Effektorzellen zu verstärken. Dabei aktiviert die  $T_H1$  Subpopulation infizierte Makrophagen mit Hilfe von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).  $T_H2$  Zellen sezernieren unter anderem die Interleukine (IL) 4, 5 und 13 zur Bekämpfung von Helminthen durch eosinophile Zellen und regen des Weiteren B-Zellen an, Immunglobulin E (IgE) freizusetzen.  $T_H17$  sezernieren IL-17, IL-22 und rekrutieren neutrophile Zellen als Antwort auf extrazelluläre Bakterien und Pilze. Die Produktion der proinflammatorischen Interleukine 9 und 22 charakterisiert die  $T_H9$  bzw.  $T_H22$  Untergruppe.  $T_H9$  und  $T_H17$  Subpopulationen scheinen zudem eine Rolle in der

Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu spielen (Eyerich et al. 2009; Plank et al. 2017); Murphy et al. 2017).  $CD8^+ \alpha\beta$  zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) erkennen über MHC I Moleküle präsentierte körperfremde oder entartete körpereigene Zellen mit dem Ziel virusinfizierte und karzinomatöse Zellen zu eliminieren (Andersen et al. 2006). Eine weitere Subpopulation stellen die regulatorischen T-Zellen (Treg) dar, die zum einen durch Freisetzung inhibitorischer Zytokine und zum anderen durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen zur Suppression des Immunsystems beitragen. Zu dieser heterogenen Gruppe an Zellen gehören die natürlichen Tregs (nTreg), die im Thymus ausdifferenzieren und eine starke Expression an CD4, CD25, dem zytotoxischem T-Lymphozyten assoziierten Antigen 4 (CTLA-4) und dem Transkriptionsfaktor *forkhead box protein P3* (FoxP3) aufweisen (Sakaguchi 2004). Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) exprimieren ebenfalls CD4, CD25, CTLA-4 und FoxP3, entwickeln sich jedoch in der Peripherie und differenzieren abhängig von den umgebenden Faktoren in verschiedene Phänotypen mit variablen Eigenschaften. So induziert beispielsweise IL-10 eine Differenzierung  $CD4^+$  T-Zellen zu Treg1 Zellen, die in der Lage sind Antigen-spezifische Immunantworten zu unterdrücken (Murphy et al. 2017; Groux et al. 1997).  $CD8^+ \alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  sowie  $CD4^-/CD8^- \gamma\delta$  T-Zellen (Tc) können des Weiteren unter bestimmten Bedingungen Zytokine produzieren, die dem Profil der  $T_H$  Zellen entsprechen. Tc1 Zellen erkennen hierbei vor allem intrazelluläre Pathogene und tumorspezifische Antigene (Wesch et al. 2001; Huber et al. 2015; Ness-Schwickerath et al. 2011). Tc2 und Tc9 Zellen fördern allergisches Asthma und Tc17 Zellen die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems (Huber et al. 2015). Voraussetzung für eine erfolgreiche Aktivierung der T-Lymphozyten ist ein Antigen-spezifisches sowie ein kostimulatorisches Signal innerhalb eines angemessenen Zytokinmilieus (Chen et al. 2013). Essentiell hierfür ist IL-2, das von  $CD4^+ \alpha\beta$  T-Lymphozyten im Unterschied zu  $CD8^+ \alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vermehrt freigesetzt wird und die Proliferation und Ausdifferenzierung der Lymphozyten stimuliert. Die mehrheitlich MHC I vermittelte Aktivierung des TZR zytotoxischer T-Zellen führt über intrazelluläre Signalkaskaden zur Synthese und Ausschüttung verschiedener Effektormoleküle.

Zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) setzen Effektormoleküle aus lytischen Granula wie zum Beispiel Perforin oder Granzyme frei (Walch et al. 2014). Die direkte Interaktion der Effektor-

und Zielzellen befähigt z.B. eine Granzym B vermittelte Aktivierung von Caspasen, welche Apoptose in der Zielzelle induzieren können. Zur Degranulation zytotoxischer Mediatoren wie Granzym B und Perforin werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Veugelers und Kollegen konnten zeigen, dass Granzym-B mit Hilfe eines multimeren Komplexes aus Perforin und dem Proteoglykan Serglycin über Mannose 6-Phosphat Rezeptor endozytotisch in das Zytosol der Zielzelle aufgenommen wird (Veugelers et al. 2006). Diskutiert wird auch die Translokation der Serinprotease durch direkte Diffusion über Perforin-induzierte Poren in der Zellmembran (Stinchcombe et al. 2007; Veugelers et al. 2006; Sutton et al. 2016). Die Freisetzung zytotoxischer Granula wird als effektiver Mechanismus von ZTLs zur Lyse von Zielzellen bezeichnet (Yasukawa et al. 2000).

Des Weiteren exprimieren ZTL Vertreter der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie wie den *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) oder den membrangebundenen Fas-Liganden (CD178). Sie binden an den TRAIL Rezeptor bzw. an das Fas Molekül (CD95) der Zielzelle oder anderer Lymphozyten und initiieren somit ebenfalls die Apoptose als eine Art Selbstregulation zur Beendigung der Immunantwort oder Abtötung infizierter Zellen (Russell et al. 2002; Jazirehi et al. 2014). Neben der Auslösung des programmierten Zelltods in Zielzellen sind ZTL auch in der Lage Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) freizusetzen. IFN- $\gamma$  trägt u.a. dazu bei, Makrophagen an den Ort einer Infektion zu locken und über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Interferon regulierender Faktor 1 (IRF-1) MHC I Moleküle verstärkt zu exprimieren, um eine möglichst vollständige Antigen Präsentation zu ermöglichen (Zhou 2009). TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$  sind u.a. in der Lage Makrophagen zu aktivieren und induzieren die zur Apoptose führende Stickoxid Produktion in Zielzellen. Über die Bindung an Tumornekrosefaktorrezeptor I induzieren sie Apoptose (Russell et al. 2002; Murphy et al. 2017).

### 1.2.2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Eine kleine Population von 1-10 % der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert einen aus einem  $\gamma$  und  $\delta$  Element bestehenden T-Zell-Rezeptor (TZR) an Stelle des  $\alpha\beta$  Heterodimers. Die

Konfiguration der Rezeptoren unterscheidet sich vor allem im Aufbau der C Regionen und ebenso auch im Winkel zwischen der C und V Region voneinander (Allison et al. 2001; Adams et al. 2015). Die Immunantwort beider T-Zellpopulationen wird über den TCR/CD3 Komplex initiiert, und ermöglicht so eine spezifische Abwehr von Pathogenen. Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wirken hierbei antiviral, -bakteriell und -tumoral (Shen et al. 2002; Willcox et al. 2012; Ravens et al. 2017). Über NKG2D, Toll-like und Notch Rezeptoren erkennen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als Teil der frühen Immunabwehr auch Signale Stress-induzierter Oberflächenmoleküle wie beispielsweise *MHC class I-related chain molecules (MIC) A/B* oder das *UL16-binding protein (ULBP) 4* (Chien et al. 2014; Wrobel et al. 2007; Shen et al. 2002).

Neben den aufgezeigten strukturellen Unterschieden bestehen auch funktionelle Unterschiede zwischen  $\gamma\delta$  und  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten (Vantourout et al. 2013).  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erkennen Antigene unabhängig von der Präsentation durch MHC Moleküle bzw. humanes Leukozyten Antigen (HLA). Zudem können sie lösliche Antigene aufnehmen und sie den  $\alpha\beta$  T-Zellen präsentieren (Brandes et al. 2009; Himoudi et al. 2012). Sie übernehmen jedoch nicht nur die Funktion Antigen-präsentierender Zellen, sie induzieren auch die Reifung dendritischer Zellen (Petrasca et al. 2014). Des Weiteren können sie zu zytotoxischen, Gedächtnis- oder regulatorischen Zellen differenzieren (Kabelitz et al. 2013; Wesch et al. 2014; Chitadze et al. 2017). Oft werden sie auf Grund dieser hohen Plastizität als Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem betrachtet (Kabelitz 2016).

Eine Bindestelle für Nicht-Peptide innerhalb der V Domäne des  $\gamma\delta$  TCR ermöglicht es den  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten Metabolite der mikrobiellen und eukaryotischen Isoprenoid Biosynthese zu erkennen (Kistowska et al. 2008). Die Entdeckung phosphorylierter Nicht-Peptide des *Mycobacterium tuberculosis* als spezifische Antigene der  $V\gamma 9V\delta 2$  Subpopulation war hierbei der Durchbruch für das Verständnis zur Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen (Constant et al. 1994). Zu den Phosphoantigenen (PAG) gehört (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphat (HMB-PP) in Prokaryonten, Isopentenylpyrophosphat (IPP), ein Intermediat der Steroidsynthese

von Eukaryonten, und dessen synthetisches Analogon Bromohydrinpyrophosphat (BrHPP), die alle selektiv  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten stimulieren (Chiplunkar et al. 2009). Physiologische Konzentrationen von IPP in Eukaryonten reichen allerdings nicht aus, um  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zu stimulieren. Im Gegensatz dazu fallen erhöhte Konzentrationen in dysregulierten Stoffwechselwegen von Tumoren an, wie zum Beispiel in Mammakarzinomen und Burkittlymphomen (Clendening et al. 2010; Gober et al. 2003). Die für postmenopausale Osteoporose und Tumor bedingte Osteolysen bereits zugelassene Medikamentengruppe der Aminobisphosphonate (n-BP) hemmt die Farnesylpyrophosphat (FFP-) Synthese, was zu einer Akkumulation phosphorylierter Zwischenprodukte wie IPP führt, und ebenfalls die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen anregt (Gogoi et al. 2013).

Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten unterscheiden sich in ihrem variablen (V) Element des TZR. In Menschen sind acht funktionell unterschiedliche  $V\delta$  Elemente und eine im Vergleich zu Varianten der  $\alpha$  und  $\beta$  Elementen weitaus geringere Anzahl von sechs variablen  $V\gamma$  Elementen bekannt. Die Mehrheit (50-95 %) der im Blut zirkulierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen erwachsener Kaukasier tragen einen  $V\gamma 9V\delta 2$  TZR. Das Repertoire des TZR variiert allerdings nach anatomischen Kompartimenten. Die  $V\delta 1$  Subpopulation dominiert beispielsweise in den Epithelien des Gastrointestinaltrakts, der Lunge und der Haut, während die  $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten den wesentlichen Anteil im Blut ausmachen (Legut et al. 2015; Kabelitz 2016; Girardi 2006; Adams et al. 2015). Die Diversität des  $\gamma\delta$  TZR wird durch Insertion von Nukleotiden zwischen einzelne Gensegmente, variable Inkorporation von D Segmenten während der V D J Rekombination und mehrere Leseraster für D Elemente theoretisch drastisch erhöht, jedoch werden vergleichsweise recht wenige Kombinationen funktionell genutzt (Elliott et al. 1988; Kazen et al. 2011; Janeway et al. 1988; Adams et al. 2015). Auch Hybride der TZR Ketten bestehend aus  $V\gamma$ - $J\beta C\beta$  Elementen konnten in gesunden Probanden identifiziert werden und vergrößern das Repertoire spezifischer  $\gamma\delta$  Rezeptoren (Davodeau et al. 1994). Ihre Diversität, hohe Plastizität und die Fähigkeit tumorspezifische Liganden zu erkennen zusammen mit ihrem zytotoxischen Potential, rücken  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zusehends in den Fokus der Tumorbiologie und Immuntherapie.

## 1.3 Aspekte der Immuntherapie

### 1.3.1 $\gamma\delta$ T-Zellabwehr gegenüber Tumoren

Im Unterschied zu  $\alpha\beta$  T-Zellen erkennen  $\gamma\delta$  T-Zellen ihre Tumorantigene HLA unabhängig. Zudem können sie Antigene aufnehmen, sie  $\alpha\beta$  T-Zellen präsentieren und so eine gezielte Abwehrreaktion der zytotoxischen  $\alpha\beta$  T-Zellen gegenüber Tumoren ermöglichen. Dies steigert ihr Potential und stellt einen Vorteil für T-Zell basierte Immuntherapien dar (Silva-Santos et al. 2015). Phosphorylierte Metabolite eines dysregulierten Mevalonat-Stoffwechsels in Tumoren bilden die Antigene für  $V\gamma9V\delta2$  T-Zellen, indem sie über die intrazelluläre B30.2 Domäne von Butyrophilin 3A1 miteinander interagieren (Sandstrom et al. 2014). Auch wenn  $V\gamma9V\delta2$  T-Lymphozyten in vielen Tumorentitäten vorhanden sind, fallen nicht immer ausreichend hohe Konzentrationen der Metabolite an, um eine Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten auszulösen. Die Applikation von n-BP und IL-2 steigert die Konzentration der phosphorylierten Antigene und ist im Stande die Aktivierung der Lymphozyten zu induzieren, sowie ihre Zytotoxizität und Chemotaxis sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu steigern (Benzaid et al. 2011). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Studienprotokolle angefertigt, die zwei verschiedene Ansätze verfolgen. Eine Strategie verfolgt den Ansatz der *in vivo* Gabe von n-BP und gering dosiertem IL-2, um eine Aktivierung von  $V\gamma9V\delta2$  T-Lymphozyten in Tumorpatienten auszulösen. Aktuelle Studien hierzu wurden beispielsweise für Patienten mit hormonrefraktärem Prostata- und fortgeschrittenem Mammakarzinom durchgeführt und zeigen eine selektive Aktivierung und Expansion der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit partieller Reduktion des Tumorwachstums (Kabelitz et al. 2004; Meraviglia et al. 2010; Dieli et al. 2007). Die andere Strategie beschreibt die Entnahme körpereigener Lymphozyten und die darauf folgende Applikation der Stimulanzen *in vitro*, mit anschließendem adoptiven Zelltransfer (AZT) der *ex vivo* expandierten  $\gamma\delta$  T-Zellen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wesch und PD Dr. Oberg ist es gelungen die Zytotoxizität humaner  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gegenüber humaner PDAC Zellen sowohl *in vivo* als

auch *in vitro* nach AZT von  $\gamma\delta$  T-Zellen zusammen mit n-BP und IL-2 in immundefizienten Mäusen, welchen zuvor xenogen humane PDAC Zellen transplantiert wurden, nachzuweisen (Kabelitz et al. 2004). Vorteil der *ex vivo* Stimulation ist eine Expansion der Lymphozyten unabhängig des derzeitigen Therapieregimes und das Vermeiden einer IL-2 vermittelten Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen (Nicol et al. 2011; Bouet-Toussaint et al. 2008; Antony et al. 2006). Die Wirksamkeit des AZT von  $\gamma\delta$  T-Zellen am Menschen wurde u. a. in klinischen Studien zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und zur Therapie solider Tumore untersucht (Kobayashi et al. 2011; Sakamoto et al. 2011; Noguchi et al. 2011). Trotz inflammatorischer Nebenwirkungen gilt der AZT als tolerabel und gut durchführbar (Hannani et al. 2012; Noguchi et al. 2011). Der Einsatz bispezifischer Antikörper ermöglicht eine zielgerichtete Therapie mit Hilfe der eingesetzten Immunzellen und eine erhöhte Effektivität dieser Therapieform. Eine Steigerung der Zytotoxizität von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gegenüber PDAC Zellen konnte durch die Applikation des *tribody* [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] im xenogenen SCID (Schwerer kombinierter Immundefekt)-Mausmodell unserer Gruppe bereits gezeigt werden und verweist auf neue therapeutische Möglichkeiten humane Pankreasadenokarzinome zu bekämpfen (Oberg et al. 2014b).

### 1.3.2 Bispezifische Antikörper

Bereits 1913 dokumentierte Paul Ehrlich die Theorie, mit Hilfe von Antikörpern Krebszellen gezielt angreifen zu können (Ehrlich 1913). Diese Vision wurde Ende der 1990er Jahre mit der Entwicklung von Rituximab, einem gegen CD20 gerichteten monoklonalen Antikörper (mAk) zur Behandlung von B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen in die klinische Praxis umgesetzt (Collins-Burow et al. 2007). Rituximab entspricht dem ursprünglichen Format eines chimären mAk bestehend aus humanem IgG mit variablen murinen anti-CD20 Fragmenten. Mit der Entwicklung von bispezifischen Antikörpern (bsAk) erweiterte sich das Repertoire der Antikörperformate und somit neben ihren pharmakokinetischen Eigenschaften auch die Funktionalität der Antikörper, da nun zwei verschiedene Bindungsspezifitäten



unterschiedlicher variabler Fragmente in einem Antikörper vorhanden waren (Morrison 2007; Brinkmann et al. 2017). Bekanntes Beispiel für ein Zielantigen ist der humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor HER2/neu, der auf der Oberfläche unterschiedlicher Adenokarzinome wie dem Mamma-, Ovarial- oder Pankreaskarzinom zum Teil überexprimiert wird (Tsiambas et al. 2006; Petricevic et al. 2013; Slamon et al. 1989). In dem von Prof. Peipp und PD Dr. Kellner (Sektion für Stammzelltransplantation und Immuntherapie) hergestellten Konstrukt [HER2xCD3] stellt neben HER2 die zweite aktivierende Bindestelle der T-Zell-spezifische Oberflächenmarker CD3 dar. Bei Bindung beider Epitope induziert der Antikörper eine räumliche Annäherung von T- und Tumorzelle und begünstigt hierbei die Aktivierung der T-Zelle. Prof. Dr. Wesch und PD Dr. Oberg konnten die Effektivität des Antikörpers bezüglich einer Verstärkung der T-Zell vermittelten Zytotoxizität gegenüber PDAC Zelllinien bereits demonstrieren (Oberg et al. 2014b). Wie bereits angedeutet gibt es mit dem *tribody* [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] ein weiteres im SCID-Mausmodell eingesetztes Format. Er besteht aus einem Fab Fragment, das gegen das Vγ9 Element des γδ TZR gerichtet ist und enthält zwei Bindestellen für das Tumorzellepitop HER2 auf variablen Einzelkettenfragmenten, um die Avidität des Antikörpers zu Tumorantigenen zu erhöhen (Oberg et al. 2014a; Oberg et al. 2015). Neben einer Steigerung der Effektivität von γδ T-Zellen in verschiedenen Zytotoxizitätstests konnte eine Reduktion des Tumorumfanges und -gewichts der PDAC im xenogenen Tumormodell die Effektivität dieses Antikörpers demonstrieren (Oberg et al. 2014b). Im Gegensatz zu herkömmlichen Stimulanzen wie Aminobisphosphonaten oder phosphorylierten Nicht-Peptiden wurde zudem mittels [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] die Restimulation von Vγ9Vδ2 T-Zellen ohne Induktion vermehrten Zelltods der Vδ2<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (Oberg et al. 2015). Die fortlaufende Weiterentwicklung von Charakteristika der Antikörper wie Größe, Avidität, Bindungsaffinität oder Halbwertszeit bietet Vorteile (Ayyar et al. 2016). Zum einen sind Antikörper auf Grund ihrer geringen Größe in der Lage selbst desmoplastisches Gewebe zu penetrieren, zum anderen ermöglicht ihre multivalente Bauweise mehrere Zellpopulationen selektiv zu aktivieren und so toxische Nebeneffekte und aufkommende Resistenzen zu minimieren. Der erste für die Therapie zugelassene bsAk Blinatumomab bindet an das auf T-Zellen exprimierte CD3 und rekrutiert diese zu CD19-exprimierenden B-Zellen. Blinatumomab wird zur Behandlung der refraktären

Akuten Lymphatischen B-Zell-Vorläufer Leukämie eingesetzt (Topp et al. 2014; Kantarjian et al. 2017; Benjamin et al. 2016). Während die Behandlung hämatologischer Erkrankungen mit bsAk voranschreitet, ist die Behandlung solider Tumore mit bsAk weitaus komplexer und Gegenstand vieler Forschungsprojekte (Ishiguro et al. 2017; Yu et al. 2017).

## 1.4 Immune escape Mechanismen von PDAC

Tumore haben Strategien entwickelt, um der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (Kuol et al. 2017). Mit zunehmender Ansammlung von Mutationen kommt es dabei zur Beeinträchtigung des Immunsystems und der Elimination karzinomatöser Zellen. Anstatt eine effektive Immunantwort auszulösen, induzieren sie Toleranz. Die erniedrigte Immunogenität des PDAC geht einher mit der erhöhten Frequenz Tumor infiltrierender CD4<sup>+</sup> Tregs und myeloider Suppressorzellen sowie einer geringen Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten in der Umgebung des Tumors (Inman et al. 2014; Roshani et al. 2014). Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wesch und PD Dr. Oberg untersuchte in Kooperation mit der AG von Prof. S. Sebens (Institut für experimentelle Tumorforschung) dieses immunsuppressive Milieu, wobei sie die Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Zellen und nicht  $\alpha\beta$  T-Zellen im Gangepithel von Pankreastumoren nachweisen konnte (Oberg et al. 2016).

Neben Tregs und Makrophagen sind auch maligne Zellen des Epithels des PDAC in der Lage immunsuppressive Zytokine zu sezernieren, beispielsweise *transforming growth factor* (TGF  $\beta$ ) oder IL-10 (Roshani et al. 2014; Inman et al. 2014). Anhand solch inhibitorischer Moleküle unterdrücken immunsupprimierende Zellen die Reifung dendritischer Zellen und deren Fähigkeit die Proliferation von T-Lymphozyten zu stimulieren (Inman et al. 2014). Doch nicht nur die Ausdifferenzierung defekter Immunzellen in der Umgebung des Tumors und eine erhöhte Anzahl von Makrophagen des immunsuppressiven M2 Phänotyps (Tumor assoziierte Makrophagen, TAM) konnte in PDAC beobachtet werden (Roshani et al. 2014; Inman et al. 2014). Auch die Expression von Gewebe Wachstumsfaktoren mit Ausbildung eines desmoplastischen Tumorstromas schirmt den Tumor vor einer Reaktion des Immunsystems ab (siehe Abschnitt 1.1.2) (Inman et al. 2014). Das PDAC exprimiert neben zahlreichen

inhibitorischen Zytokinen und Liganden zudem Enzyme, die die lokale Immunantwort vermindern können. Zu ihnen zählt die Cyclooxygenase 2 (COX2), deren Metabolit Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) eine Immunantwort unterdrückt, und die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) mit dessen immunsuppressivem Metabolit Kynurenin (Witkiewicz et al. 2008; Gonnermann et al. 2015).

### **1.4.1 Indolamin-2,3-Dioxygenase**

Bei dem Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) handelt es sich um eine Dioxygenase, die durch die Addition von Sauerstoff eine oxidative Spaltung aromatischer Pyrrolringe katalysiert. IDO ist wenig substratspezifisch und bindet neben Tryptophan weitere Substanzen, die einen Indolring enthalten, wie Serotonin und Tryptamin (Macchiarulo et al. 2009). Im Tryptophankatabolismus vermittelt IDO den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbauwegs, wobei die Reaktion von Tryptophan zu N-Formylkynurenin beschleunigt wird (Macchiarulo et al. 2009). Ein weiterer Metabolit dieses Stoffwechselwegs ist Picolinsäure mit sowohl neuroprotektiven als auch Makrophagen stimulierenden und antifungalen Eigenschaften (Chen et al. 2009; Varesio et al. 1990). Endprodukte des Katabolismus stellen Nikotinsäure bzw. -säureamid dar, die essenziell für die Produktion von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) und somit bedeutend für die Energiegewinnung sind. In moderaten Konzentrationen wird IDO in allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert.

Neben IDO1 existieren die Isoenzyme IDO2 und Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) (Brochez et al. 2017). Das Gen für IDO2 wurde 2007 erstmals beschrieben (Metz et al. 2007). Seine Bedeutung ist in weiten Teilen noch ungeklärt. Aufgrund weitverbreiteter genetischer Polymorphismen scheint das Enzym eine geringere katalytische Aktivität zu besitzen und eine untergeordnete Rolle im Tryptophanabbau zu spielen (Witkiewicz et al. 2009; Löb et al. 2009; Meininger et al. 2011; Munn et al. 2016). Im Gegensatz zu IDO ist TDO substratspezifisch und katalysiert nur die Umwandlung von L-Tryptophan. Es wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, wo seine Hauptaufgabe darin besteht die systemische Tryptophan Konzentration aufrecht zu erhalten (Platten et al. 2014). Die antiproliferativen

Effekte von IDO auf Bakterien, Viren und Protozoen sind seit über 30 Jahren Gegenstand der Forschung (Schmidt et al. 2014). Nicht nur in der Erregerabwehr spielt der Mangel an Tryptophan und die Ansammlung von Metaboliten des Kynurenin Stoffwechselwegs eine Rolle. Die Expression von IDO kann auch dazu führen, dass Antigene nicht mehr richtig präsentiert werden und die T-Zell Immunantwort versagt (Munn et al. 2016; Frumento et al. 2002; Prendergast et al. 2014). Mittels IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Lipopolysacchariden kann die Immunsuppression durch Induktion des Enzyms zudem verstärkt werden (Taylor et al. 1991; Robinson et al. 2003; Munn et al. 1999). Niedrige Tryptophan Spiegel führen hierbei unter anderem über die Aktivierung der *general control non-derepressible 2-* (GCN-2) Kinase zu Zellzyklusarrest und Apoptose von T-Lymphozyten. Die Akkumulation der Metabolite im mikromolaren Bereich, wie sie beispielsweise in Tumoren beobachtet worden ist, führt über Bindung des *aryl hydrocarbon receptor* (AHR) zudem zur Ausdifferenzierung eines regulatorischen Phänotyps in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und dendritischen Zellen sowie zu einer Reduktion der Zytotoxizität der T-Lymphozyten. In Tumorzellen scheint die Expression von IDO zudem mit onkogenen Signalwegen in Verbindung zu stehen, die über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *signal transducer and activator of transcription* (STAT3) oder *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B) gesteigert wird (Platten et al. 2014; Opitz et al. 2011; Mezrich et al. 2010).

Die Unterstützung des Tumorwachstums durch Überexpression von IDO ist in verschiedenen Tumoren unter anderem auch im Pankreaskarzinom beschrieben worden und ist assoziiert mit einer schlechten Prognose. Das Rezidiv freie Überleben von Patientinnen mit Endometriumkarzinom, aber auch die Gesamtüberlebensrate von Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom korreliert invers mit der Höhe der IDO Expression (Uyttenhove et al. 2003; Witkiewicz et al. 2008; Godin-Ethier et al. 2011). Neben der Induktion einer tolerogenen Tumormikroumgebung trägt IDO auch dazu bei Stammzellen ähnliche Tumorzellen in einen Zustand der Seneszenz (engl. *dormancy*) zu versetzen. In diesem dysfunktionalen Stadium ist die Tumorzelle vital, jedoch nicht in der Lage sich zu entwickeln oder zu proliferieren. Es konnte demonstriert werden, dass in Melanomen die IDO1

vermittelte Aktivierung des AHR Tumorzellen vor der Apoptose bewahrt und stattdessen einen Zustand der „Erschöpfung“ induziert (Liu et al. 2017).

Um diesen Resistenzmechanismus gegenüber einer T-Zell vermittelten Immunantwort zu überwinden, werden derzeit IDO Inhibitoren wie Indoximod in klinische Studien der Phasen I und II in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika eingesetzt (Brochez et al. 2017). Indoximod, bestehend aus 1-Methyl-D-Tryptophan (1-D-MT), ist eine chemische Verbindung, die IDO und TDO hemmt (Bakmiwewa et al. 2012; Austin et al. 2015). Eine Phase II Studie bei metastasiertem Pankreaskarzinom musste allerdings aufgrund von signifikanten Nebenwirkungen eines Patienten, die zu einer Kolitis führten, abgebrochen werden. Das Stereoisomer 1-Methyl-L-Tryptophan (1-L-MT) hemmt hingegen selektiv IDO1. Epcadostat, ebenfalls ein IDO1 Inhibitor, zeigt vor allem in der Therapie des malignen Melanom Erfolg und ist in eine klinische Studie der Phase III eingeschlossen worden (Brochez et al. 2017). Neben 1-D-MT und 1-L-MT wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Tenatoprazol und 680C91 verwendet. Tenatoprazol ist ein bereits als Protonenpumpeninhibitor zugelassenes Therapeutikum, das als IDO2 Inhibitor identifiziert wurde. In klinischen Studien findet es derzeit keine Anwendung (Bakmiwewa et al. 2012). Ein Inhibitor der TDO, die chemische Verbindung 680C91, ist in der Lage die Toleranz gegenüber TDO überexprimierenden Tumoren *in vitro* zu inhibieren und im Mausmodell eine Abstoßungsreaktion einzuleiten (Pilotte et al. 2012).

## 2. Fragestellung

Im Rahmen der Promotionsarbeit sollte ein möglicher Resistenzmechanismus einiger PDAC Zelllinien gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse untersucht werden. Basierend auf den Studien von Witkiewicz und Kollegen sowie den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, dass  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten PDAC Zellen verschieden gut lysieren, sollte die IDO Expression und Aktivität sowohl in suszeptiblen als auch resistenten PDAC Zelllinien analysiert werden (Witkiewicz et al. 2008; Witkiewicz et al. 2009). Hierbei sollte u.a. bestimmt werden, ob PDAC Zelllinien metastasierenden Ursprungs mehr IDO exprimieren als die aus primären Tumoren. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern IDO in PDAC Zellen durch die Stimulation mit Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , welches  $\gamma\delta$  T-Zellen nach (Ko)kultur mit PDAC Zellen vermehrt produzieren, induziert werden kann. Ein möglicher inhibitorischer Effekt des Produkts Kynurenin auf die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten sollte in einem Zytotoxizitätstest mit dem Real-Time-Cell-Analyzer sowie im CD107a Degranulierungstest unter Verwendung von PDAC Zelllinien als Zielzellen überprüft werden. Hierfür wurden unterschiedliche PDAC Zellen mit  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten kokultiviert, die aus dem Blut von freiwilligen Spendern etabliert und propagiert wurden. Ein weiteres Ziel der Arbeit sollte es sein, in Zytotoxizitätsassays den Einfluss von IDO Inhibitoren auf die zytotoxische Kapazität der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu studieren.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und ihre Herkunft

Name	Unternehmen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Protein Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem, Darmstadt
<i>enhanced chemiluminescence</i> (ECL)	GE Healthcare, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Eosin	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Karlsruhe
Ficoll®-Hypaque (1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Braun, Melsungen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Hyper ECL Filme	GE Healthcare, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Frema Granitova, Heimertingen

<b>Name</b>	<b>Unternehmen</b>
Monensin	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaF	Merck, Darmstadt
NaN <sub>3</sub>	Sigma, Taufkirchen
NaOH	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, München
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Buchs
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
<i>Perm/Wash</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Ponceau S	GE Healthcare, München
Propidiumiodid	Serva, Heidelberg
RPMI 1640	Life Technologies, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris gepufferte Salzlösung	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, Taufkirchen



### 3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen mit der entsprechenden finalen Konzentration

Name	Substanz oder Unternehmen
Bis-Tris Gel 4-12 % „NuPage“	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Einfriermedium	ad. Vol. RPMI 1640 20 % (v/v) FKS 10 % (v/v) DMSO
Eosinlösung zur Zellzahlbestimmung	2 g Eosin 0,25 g NaN <sub>3</sub> 450 ml NaCl-Lösung (0,9 % ) 50 ml FKS
FACS Fixierlösung	PBS 0,1 % (w/v) PFA
<i>FACS staining buffer</i>	PBS 1 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub>
FACS Waschpuffer	PBS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub> 1 % (w/v) BSA
PI Lösung	PBS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub>

<b>Name</b>	<b>Substanz oder Unternehmen</b>
PI Lösung (Fortsetzung)	1 % (w/v) BSA 2 µg/ml Propidiumiodid
<i>SDS running buffer „NuPage MES“</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
<i>SDS sample buffer</i>	200 mM Tris pH 6,8 6 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerol 0,0025 % (w/v) Bromophenolblau 5 % β-Mercaptoethanol
TBS-T	100 mM Tris 1,5 M NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
TNE Lyse Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 2 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 4 % (v/v) Complete Protease Inhibitor
Transfer Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 25 % (v/v) Methanol
Trypsin/EDTA	0,05 % (w/v) Trypsin

Name	Substanz oder Unternehmen
Trypsin/EDTA (Fortsetzung)	0,02 % EDTA PBS
Zellkulturmedium	RPMI 1640 Fertigmedium mit 25 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 10 % FKS

### 3.1.3 Zytokine und andere Stimulanzen

**Tabelle 3: Zytokine und weitere Stimulanzen in ihrer vorher austitrierten finalen Konzentration**

[BrHPP: Bromohydrinpyrophosphat; r: rekombinant; Dup697: 5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-methylsulfonylphenyl)thiophene]

Name	Finale Konzentration	Firma
1-Methyl-Dextro-Tryptophan (1-D-MT) in NaOH	1 mM	Sigma, Taufkirchen Enzo, Lörrach
1-Methyl-Levo-Tryptophan (1-L-MT) in NaOH	1 mM	Sigma, Taufkirchen Enzo, Lörrach
680C91 in DMSO	0,1 mM	R&D Systems, Wiesbaden
BrHPP	300 nM	Innate Pharma, Marseille
Dup697	50 µM	R&D Systems, Wiesbaden
rIFN-γ	100 ng/ml, 500 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
rIDO	0,22 mg/ml	R&D Systems, Wiesbaden

Name	Finale Konzentration	Firma
[(HER2) <sub>2</sub> xV $\gamma$ 9]	1 $\mu$ g/ml	Labor Prof. D. Wesch/ Prof. M. Peipp/ PD Dr. Oberg/ PD Dr. C. Kellner
rIL-2	12,5; 14,7 und 50 U/ml	Novartis, Basel
L-Kynurenin	1 mM	R&D Systems, Wiesbaden
Picolinsäure	1 mM	Sigma, Taufkirchen
Tenatoprazole in DMSO	0,1 mM	Abcam, Cambridge
Zoledronat	2,5 $\mu$ M	Novartis, Basel

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 Monoklonale Antikörper für Oberflächenfärbungen

**Tabelle 4: Monoklonale Antikörper (mAk) bei Oberflächenfärbungen. Finale Konzentration oder Verdünnung ist angegeben. Die mAk wurden vorher austitriert. (#: Bestellnummer)**

Antigen	Fluorochrom	Klon	Konzentration/ Verdünnung	Firma
IgG1	AF647	MOPC21	20 $\mu$ g/ml	BioLegend, Fell
IgG1	FITC	X40	10 $\mu$ g/ml	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1	PE	X40	10 $\mu$ g/ml 50 $\mu$ g/ml	BD Biosciences, Heidelberg
CD3	AF647	SK7	20 $\mu$ g/ml	BioLegend, Fell
CD107a	PE	H4A3	50 $\mu$ g/ml	BD Biosciences, Heidelberg
$\gamma\delta$ TZR	PE	11F2	25 $\mu$ g/ml	BD Biosciences, Heidelberg
V $\gamma$ 9 TZR	FITC	7A5	20-25 $\mu$ g/ml	Labor Prof. D. Wesch/ Prof. D. Kabelitz/ Prof. O. Janssen

### 3.1.4.2 Monoklonale Antikörper für intrazelluläre Färbungen

**Tabelle 5: Monoklonale Antikörper bei intrazellulären Färbungen. Finale Konzentration oder Verdünnung mit der jeweiligen Bestellnummer ist angegeben.**

Antigen	Fluorochrom	Klon	Konzentration/ Verdünnung	Firma
IgG1	APC	X40	1 µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
IDO	APC	700838	1 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden

### 3.1.4.3 Antikörper für Westernblot

**Tabelle 6: Bei Westernblot eingesetzte Antikörper. Die vorher austitrierte finale Konzentration oder Verdünnung mit der jeweiligen Bestellnummer ist angegeben. (Monoklonal: anti-IDO1, anti-IDO2, anti-GAPDH, anti-β-Actin Antikörper, Polyklonal: Esel anti-Hase und Schaf anti-Maus Antikörper)**

Antigen	Konjugat	Klon/Spezies	Konzentration/ Verdünnung	Firma
β-Actin	-	AC 15	1: 5000	Sigma, Taufkirchen, # A5441
GAPDH	-	6C5	1: 10000	R&D Systems, Wiesbaden, # 2275_PC-100
IDO1	-	1A3	0,5 µg/ml	Origene Technologies, Herford
IDO2	-	1A4	1 µg/ml	Origene Technologies, Herford
Hase	POD	Esel	1: 7500	GE Healthcare, München, # NA9340
Maus	POD	Schaf	1: 7500	GE Healthcare, München, # NA931

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6er Platte	Greiner, Frickenhausen
12er Platte	Greiner, Frickenhausen
24er Platte	Greiner, Frickenhausen
96er Platte, U-Boden	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
96er Platte, V-Boden	Nerbe, Winsen/Luhe
96er Platte, E-plates	ACEA, San Diego, USA
Einfrierröhrchen CryoTube™	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
FACS-Röhrchen 0,6 ml	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Whatman Papier	Biorad, München
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2-2 ml)	Sarstedt, Sarstedt
Reaktionsgefäße (15-50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (50-650 ml)	Greiner, Frickenhausen

### 3.1.6 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete humane PDAC und Mammakarzinom Zelllinien. Charakterisierung der Pankreaskarzinomzelllinien in (Sipos et al. 2003). Genotypische Überprüfung der Linien durch „Short Tandem Repeat Analysis“.

Tumorzelllinie	Spezifität	Herkunft/Ursprung
BxPC3	primäres PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff
Capan-1	Lebermetastase eines PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff

<b>Tumorzelllinie</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Herkunft/Ursprung</b>
Capan-2	primäres PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff
Colo357	Lymphknotenmetastase eines PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff
MCF-7	aus einem Pleuraerguss stammende Zellen eines Mammaadenokarzinom	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff
Panc1	primäres PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff
Panc89	Lymphknotenmetastase eines PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff
PancTu-1	primäres PDAC	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff

### 3.1.7 Geräte

**Tabelle 9: Geräte und jeweilige Hersteller**

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting Kassette	Wet/Tank Blotting System	Biorad, München
CO <sub>2</sub> Inkubator	Heracell 240	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Minigel	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Göttingen
	Axiovert 10	Zeiss, Göttingen
Pipetten	0,1-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Multikanal 5-50 µl	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
	Multikanal 50-300 µl	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
	Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettus	Hirschmann, Eberstad

Gerät	Typ	Hersteller
Real-Time-Cell-Analyzer (RTCA)	Single Plate Assay	ACEA, San Diego, USA
Sterilbank	Lamin Air™	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Spectrophotometer	Smartspec 3000	Biorad, München
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Zählkammer	Neubauerzählkammer	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Zentrifugen	Megafuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
	Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
	Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau

### 3.1.8 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Biosciences, Heidelberg
IBM SPSS Statistics	IBM Deutschland, Ehningen
Microsoft Office	Microsoft, München
RTCA Software	ACEA, San Diego, USA

### 3.1.9 Statistik

Die Daten von biologischen Replikaten wurden mit einem parametrischen Student's t-Test nach Überprüfung der Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test mittels Microsoft Excel oder IBM SPSS Statistics auf statistische Signifikanz überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt.



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen

Die Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque Lösung (spez. Dichte 1,077 g/ml) trennt unterschiedliche Zellpopulationen des Blutes anhand ihrer Dichte. Die verwendeten T-Lymphozyten konnten entweder aus Vollblut von Hausspendern oder aus Leukozytenrückhaltesystemen (Kegel) der Blutspende des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) gewonnen werden. Das Einverständnis zur Blutspende und der Ethikkommission wurde eingeholt (D404/14 und D405/10). Heparinisiertes Vollblut wurde 1:2 in PBS bei Raumtemperatur (1:10 im Falle eines Kegels) verdünnt. Daraufhin wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:3 über das Separations-Medium, eine wässrige Mischung aus Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymeren (Ficoll-Hypaque Lösung) geschichtet. Nach der Zentrifugation mit 751 g für 20 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur enthielt der Überstand überwiegend Plasma und Thrombozyten, die Interphase die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) mit den Monozyten und Lymphozyten, die sich oberhalb der Ficoll-Hypaque Lösung befanden. Das Zellsediment bildeten die eine höhere Dichte besitzenden Erythrozyten und Granulozyten. Anschließend wurde die Interphase per Pipettus eingesammelt und mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  verdünnt und für 5 Minuten bei 481 g zentrifugiert. Nach zwei zusätzlichen Waschschritten mit PBS für 10 Minuten bei 188 g, bei denen Reste des Ficolls und übrige Thrombozyten entfernt worden sind, wurden die Zellen in Zellkulturmedium (mit 10 % FKS) überführt.

#### 3.2.1.2 Zellquantifizierung und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden mit Eosin angefärbte Zellen in einer Neubauer Zählkammer bestimmten Volumens gezählt. Die Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen gelang, weil die Membrandurchlässigkeit toter Zellen dazu führt Eosin aufzunehmen

und sie somit rot anzufärben. Die Zellkonzentrationen ergaben sich aus Multiplikation von Zellzahl, Verdünnungs- und Kammerfaktor ( $10^4$ ).

### 3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Der Wassergehalt einer Zelle führt in festem Aggregatzustand zur Ausbildung von Eiskristallen. Sie sind im Stande die Zellmembran irreparabel zu schädigen und können das Bersten der Zelle zur Folge haben. Die Aufbewahrung von Zellen in einem speziellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzten Medium in flüssigem Stickstoff verhindert dies jedoch und es ermöglicht die Vitalität der Zelle aufrecht zu erhalten.

Zunächst wurden die Zellen bei 317 g für 5 Minuten zentrifugiert. Sie wurden auf Eis in Medium benannt nach dem *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) mit 20 % fötales Kälberserum (FKS) und 10 % DMSO versetzt und resuspendiert. Konzentriert auf bis zu  $3 \times 10^7$  Lymphozyten/ml und  $6 \times 10^6$  Tumorzellen/ml lagerten sie erst für 30 Minuten bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , dann über Nacht bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . In den nächsten Tagen bzw. am darauffolgenden Tag wurden sie bei  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.2.1.4 Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien

Aus den isolierten PBMZ wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien angelegt. Hierfür wurden  $10^6$ /ml PBMZ in Zellkulturmedium à 5 ml pro Kavität in 6er Platten kultiviert und bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  mit 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Zugabe von Zoledronat in einer Endkonzentration von  $2,5\text{ }\mu\text{M}$  ermöglichte die selektive Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen. IL-2 als essenzieller Wachstumsfaktor wurde den  $\gamma\delta$  T-Zellen initial und dann alle 2 Tage in einer Endkonzentration von 50 U/ml hinzugefügt, um ein optimales Wachstum zu ermöglichen. Nach 14 Tagen enthielten die Kulturen 80-98 %  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$   $\gamma\delta$  T-Zellen. Die Reinheit der Zellen wurde mittels Oberflächenmarkierung von FITC-anti-V $\delta 2$ , PE-anti- $\gamma\delta$  TCR und AF647-anti-CD3 mAk (Tabelle 4) am Durchflusszytometer überprüft.

### 3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die fluoreszenzaktivierte Zellseparation (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) erlaubt die Analyse von mit Fluorochromen gekoppelten Oberflächen- und/oder intrazellulären Antikörpern auf und in Zellen. Ziel dieses Verfahrens ist die Charakterisierung einzelner Zellverbände. Ein am Durchflusszytometer erzeugter Überdruck saugt die Zellsuspension an, welche dem Gerät in einem Röhrchen zugeführt wird. Zusammen mit dem umgebenden Flüssigkeitsstrom des Gerätes wird die Zellsuspension dann in Einzelzellen aufgetrennt, die den von einem oder mehreren Lasern ausgesendeten Strahl monochromatischen Lichts passieren (hydrodynamische Fokussierung). Der daraufhin angeregte Komplex aus Zelle und Fluochrom streut das Licht. Gemessen wird die Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) mit  $< 10^\circ$  Ablenkung als Maß für die Größe der Zelle und die Seitwärtsstreuung (*sideward scatter*, SSC) mit  $90^\circ$  Ablenkung als Maß für die Granularität einer Zelle. Die angeregten an Antikörper gekoppelten Fluorochrome emittieren zudem das absorbierte Licht in charakteristischen Wellenlängen, was eine weitere Form der Charakterisierung ermöglicht. Die für diese Arbeit verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Verwendete Fluorochrome**

<b>Fluorochrom</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Absorptionsmaximum</b>	<b>Emissionsmaximum</b>
Alexa Fluor® 647	AF647	650 nm	665 nm
Allophycocyanin	APC	625, 652 nm	660 nm
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	495 nm	519 nm
Phycoerythrin	PE	495, 529-534, 565 nm	575 nm
Propidiumiodid	PI	488 nm	590 nm
		535 nm	617 nm
		(DNA interkalierend)	(DNA interkalierend)

Gemessen wurde an einem FACS Calibur, welcher mit zwei Lasern ausgestattet ist und die parallele Messung von vier Fluorochromen ermöglicht. Die gleichzeitige Verwendung mehrerer Fluorochrome bei einer Probe bedingt den Einsatz von unterschiedlichen

Emissionsmaxima bzw. -spektren pro Fluorochrom sowie die Einstellung von Kompensationen um eine mögliche Überlappung der Emissionsspektren und somit fehlende Differenzierbarkeit zu verhindern.

### 3.2.2.1 Markierung von Oberflächenantigenen

$10^5$ - $10^6$  Zellen wurden bei 239 g für 4 Minuten bei 4 °C in 96er V-Mikrotiterplatten mit Waschpuffer (WP) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 25 Minuten bei 4 °C ohne Lichteinfluss mit je 7 µl eines oder mehrerer Fluorochrom gekoppelter Antikörper inkubiert. Auf Grund der Autofluoreszenz von Zellen, deren Expression von Fc-Rezeptoren (unspezifischer Bindung) und als Negativkontrolle zum Setzen von Markern wurden bei jeder Messung nicht nur Proben mit Oberflächenantikörpern, sondern auch solche mit spezifischen Kontrollantikörpern analysiert. Die verwendeten Kontrollantikörper hatten den gleichen Isotyp wie die zu untersuchenden Primärantikörper, binden jedoch nicht an humane Zellen.

Gefolgt von zwei Waschschritten mit WP (239 g, 4 °C, 4 Minuten) um ungebundene Antikörper aus der Probe zu entfernen, wurden die Zellen schließlich in 1 % Paraformaldehyd (PFA) lösungsmittelfixiert aufgenommen und innerhalb einer Woche gemessen.

### 3.2.2.2 Markierung von intrazellulären Proteinen

Damit ein Antikörper intrazellulär binden kann, muss die zu untersuchende Zelle permeabilisiert und fixiert sein. Um also die Diffusion des Fluorochrom gekoppelten Antikörpers in die Zelle zu gewährleisten, wurde das Färbeprotokoll abgeändert. Die intrazelluläre Markierung von IDO erfolgte, indem zunächst  $10^5$ - $10^6$  Zellen in 96er V-Mikrotiterplatten bei 239 g für 4 Minuten bei 4 °C in *staining buffer* (PBS mit 1 % FKS und 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) zentrifugiert wurden. Anschließend wurden sie in 100 µl/Probe Cytofix/Cytoperm resuspendiert und dann für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit *Perm/Wash* (PW) mit 239 g bei 4 °C für 4 Minuten wurden 50 µl APC-anti-IDO/Probe (Tabelle 5) hinzugefügt und für 25 Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde zweimal mit PW

gewaschen und die Zellen wurden anschließend in 1% PFA Lösung resuspendiert und aufgenommen. Es erfolgte die direkte Messung und Analyse am FACS Calibur mit Hilfe der CellQuest Pro Software.

### 3.2.2.3 Propidiumiodid Färbung

Zur Diskriminierung der Zellviabilität (und auch zur Bestimmung des DNA Gehalts einer Zelle) wird die durchflusszytometrische Analyse einer Propidiumiodid (PI) Färbung verwendet. Der Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid durchdringt perforierte Zellmembranen, die ihre Vitalität verloren haben, und ist so im Stande zwischen apoptotischen/nekrotischen und vitalen Zellen zu unterscheiden.

$2-5 \times 10^5$   $\gamma\delta$  T-Zellen (mit 50 U/ml IL-2 final) in 96er U-Mikrotiterplatten bzw.  $1 \times 10^5$  Tumorzellen in 24-Kavitäten-Flachboden-Kulturplatten wurden mit der zu testenden Substanz für 24 h in Zellkulturmedium (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Als Nächstes wurden die Zellen in 96er V-Mikrotiterplatten überführt, was im Falle der Tumorzellen das Ablösen der adhären Zellen mittels Trypsin und Nachspülen der Rundböden mit kaltem PBS beinhaltete. Die Proben wurden mit 239 g bei 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert und im Anschluss mit Waschpuffer (WP) gewaschen. Daraufhin wurden je 100 µl PI-Lösung (Konzentration 2 µg/ml in WP, Tabelle 1) hinzu pipettiert und die Lösung für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer aufgenommen und nach PI Markierung, Größe (FSC) und Granularität (SSC) analysiert.

### 3.2.2.4 Degranulierungstest

Aktivierete zytotoxische T-Zellen wie auch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten setzen Granzyme oder Perforin aus sekretorischen Lysosomen (lytischen Granula) frei. Ein solcher Vorgang kann in der Detektion des lysosomal assoziierten Membranglykoproteins CD107a (Lysosomen assoziiertes Membranprotein, LAMP-1) durchflusszytometrisch analysiert werden. CD107a wird während der Degranulation transient an der Oberfläche der T-Zellen exprimiert und stellt somit ein Markerprotein der Degranulation dar. Der Test begann damit, dass 5 bzw.  $7,5 \times 10^3$  unterschiedliche PDAC Zellen in Zellkulturmedium in 96er Flachboden-

Mikrotiterplatten ausgesät wurden. Für 20 Stunden wurden die Tumorzellen entweder mit 50 µl Medium oder mit den finalen Konzentrationen von 1 mM 1-D-MT, 1-L-MT oder NaOH inkubiert. Parallel wurden  $25 \times 10^4$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in Zellkulturmedium in einer Extraplatte ausgesät. Sie wurden für 20 Stunden mit 15 U/ml IL-2 in Medium oder einer Endkonzentration von 1 mM L-Kynurenin inkubiert. Danach wurden mit BrHPP (Tabelle 3) restimulierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten (aus der separat angesetzten Platte) in einem Effektor:Zielzell Verhältnis von 25:1 zu den PDAC Zellen gegeben. In einigen Versuchen erfolgte auch die direkte Zugabe von L-Kynurenin zusammen mit den Lymphozyten zu den PDAC Zellen. Zur Kontrolle wurden auch Proben mit nicht restimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durchgeführt. Zudem wurden je 10 µl des monoklonalen Antikörpers PE-anti-IgG1 oder PE-anti-CD107a (Tabelle 4) in die Probe pipettiert. Nach einer Stunde in (Ko)kultur wurde der Inhibitor Monensin (3 µM) hinzugegeben, welcher den Transport von Zytokinen verhindert und somit deren intrazelluläre Akkumulation am Golgi-Komplex fördert. Eine Oberflächenfärbung mit dem FITC-markierten anti-V $\gamma$ 9 TZR mAk gemäß dem Färbeprotokoll für Oberflächenfärbungen (Abschnitt 3.2.2.1 und Tabelle 4) schloss sich nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 24 Stunden an. Die Messung der CD107a Expression und die daraufhin durchgeführte Analyse erfolgte am FACS Calibur mittels der CellQuest Pro Software.

### 3.2.3 Real-Time-Cell-Analyzer

Der Real-Time-Cell-Analyzer (RTCA) oder auch xCELLigence System (ACEA, San Diego, US) ermöglicht es, die  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse der PDAC Linien in Echtzeit und kontinuierlich zu beobachten. Bei diesen Ansätzen adhären die Tumorzellen in speziellen 96er Flachbodenplatten (E-Platten) auf einer aus Goldelektroden bestehenden Matrix. Das System beruht darauf, dass diese Sensoren die Impedanz jeder Vertiefung messen. Die Impedanz, angegeben als Zellindex, wird durch die Anlagerung der Tumorzellen an den Boden der Vertiefungen beeinflusst, und zwar proportional zur Zelldichte. Man kann also sagen, dass die Veränderung der Impedanz Rückschlüsse auf Anzahl und Morphologie, aber auch auf Adhäsionsvermögen und Vitalität der einzelnen Zellpopulationen zulässt. Die Methode benötigt keine Art von radioaktiver oder Antikörper vermittelter Markierung. 5000-7500 PDAC Zellen wurden in 96er E-Platten ausgesät und für 24 Stunden mit entweder

50 µl Medium, finalen Konzentrationen von 1 mM 1-D-MT, 1-L-MT, NaOH, DMSO 1:1000 oder 0,1 mM Tenatoprazol oder 680C91 inkubiert. Von den Proben wurde alle 5 Minuten der Zellindex gemessen. Parallel wurden  $3,75 \times 10^5$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in Zellkulturmedium in einer 96er U-Mikrotiterplatte ausgesät. Sie wurden für 24 Stunden mit Medium, 1 mM L-Kynurenin oder Picolinsäure final inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zu 80-95 % reinen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen (aus der U-Mikrotiterplatte), die mit BrHPP (300nM final) oder 1 µg/ml final [(HER2) $_2$ xV $\gamma$ 9] restimuliert wurden, zusammen mit 12,5 U/ml IL-2 im Effektor:Zielzell Verhältnis von 12,5:1 oder 25:1 zu den PDAC Zellen gegeben. Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vermittelte Lyse der PDAC Zellen wurde anhand der Impedanz in der Regel alle 3 Minuten gemessen (mögliche Abweichungen sind u.a. den Bildunterschriften des Ergebnisteils zu entnehmen). Sie wurde mit der durch 1 % Triton-X-100 hervorgerufenen maximalen Lyse verglichen.

### 3.2.4 Western Blot Analyse

Der Western Blot dient der Identifizierung und/oder Quantifizierung bestimmter Proteine. Im Allgemeinen versteht man darunter die Übertragung (engl. *to blot*, klecksen) von Proteinen auf eine Membran mit anschließendem Antikörper vermitteltem Nachweis eben dieser Proteine. Daher spricht man auch von einem Immunblot.

Zur Herstellung der Lysate wurden nach 48 stündiger Kultivierungsphase mit oder ohne rIFN- $\gamma$  zunächst  $10^6$  Tumorzellen/Probe für 5 Minuten bei 317 g mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 Minuten auf Eis mit je 100 µl einer Lösung, hergestellt aus 960 µl TNE Lyse-Lösung und 40 µl Complete Protease Inhibitor, inkubiert. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 13800 g. Danach wurden die Überstände entnommen und ihr jeweiliger Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Die Methode beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau bei Bindung an Proteinen von 465 nm auf 595 nm verschiebt, was mit einem Spektrophotometer detektierbar ist. Es wurde je 5 µl des Überstands bzw. des reinen Lyse Puffers als Negativkontrolle zu 995 µl Coomassie Protein Reagenz gegeben, nach 10 Minuten

Inkubationszeit wurde die Absorption gemessen und in Vergleich zu einer Standardkurve aufgetragen.

Die folgende Auftrennung der Proteine geschah über die Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese proportional zu ihrer Molekülmasse. Das anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladungen der Proteine, sodass hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben werden und Proteine aus der Sekundär- und Tertiärstruktur in eine lineare Form übergehen und eine einheitlich negative Ladung bekommen. Dadurch werden die Proteine nach ihrer Größe und nicht nach ihrer Ladung aufgetrennt. Durch das niedermolekulare  $\beta$ -Mercaptoethanol im *sample buffer* wurden die Disulfidbrücken reduziert. Zunächst wurden je 10  $\mu\text{g}$  Protein (bzw. 100 ng rIDO) mit destilliertem Wasser auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit je 5  $\mu\text{l}$  *SDS sample buffer* 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und abgefugt um eine vollständige Denaturierung der Proteine und Inhibition der Proteasen zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Proben in die Taschen eines Minigels geladen. Die SDS-PAGE wurde bei 200 Volt in circa 60 Minuten durchgeführt, bzw. solange bis die mit Bromphenolblau angefärbten Banden das Ende des Gels erreicht hatten. Es folgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Hierfür wurde eine gekühlte und mit Transfer Puffer aufgefüllte Kassette im Sandwichverfahren mit Schaumstoffschwamm, Whatman Papieren, Gel und Nitrozellulosemembran beladen, um im Folgenden bei 100 Volt für 60 Minuten zu blotten. Die fertige Nitrozellulosemembran wurde zum Proteinnachweis mit Ponceau S angefärbt. Anschließend wurde mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBS + 0,05% Tween (TBS-T) für 1 Stunde geblockt. Ziel war es unspezifische Proteinbindungsstellen abzudecken und die Sensitivität des Primär- aber auch Sekundärantikörpers zu erhöhen. Es folgte das Waschen auf einem Schüttler mit TBS-T für mindestens 10 Minuten. Die Inkubation der Membran mit dem monoklonalen Primärantikörper anti-IDO1 [mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBS-T, Tabelle 6] geschah auf einem Rotator über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen für je mindestens 10 Minuten mit TBS-T auf einem Schüttler wurde die Membran mit polyklonalem Schaf anti-Maus-Meerrettichperoxidase (POD) Sekundärantikörper [mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBS-T] für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T für je mindestens 10 Minuten wurde die Membran für eine Minute in 10 ml einer *enhanced*



*chemiluminescence* (ECL) Lösung überführt. Die Peroxidase ist im Stande das hinzugegebene ECL Substrat zu oxidieren und dabei Licht freizusetzen. Zur Visualisierung werden Hyper-ECL Filme verwendet, welche die Lumineszenz detektieren können. Die Entwicklung und Fixierung der Filme wurde für 1 bis 20 Minuten Expositionszeit durchgeführt.

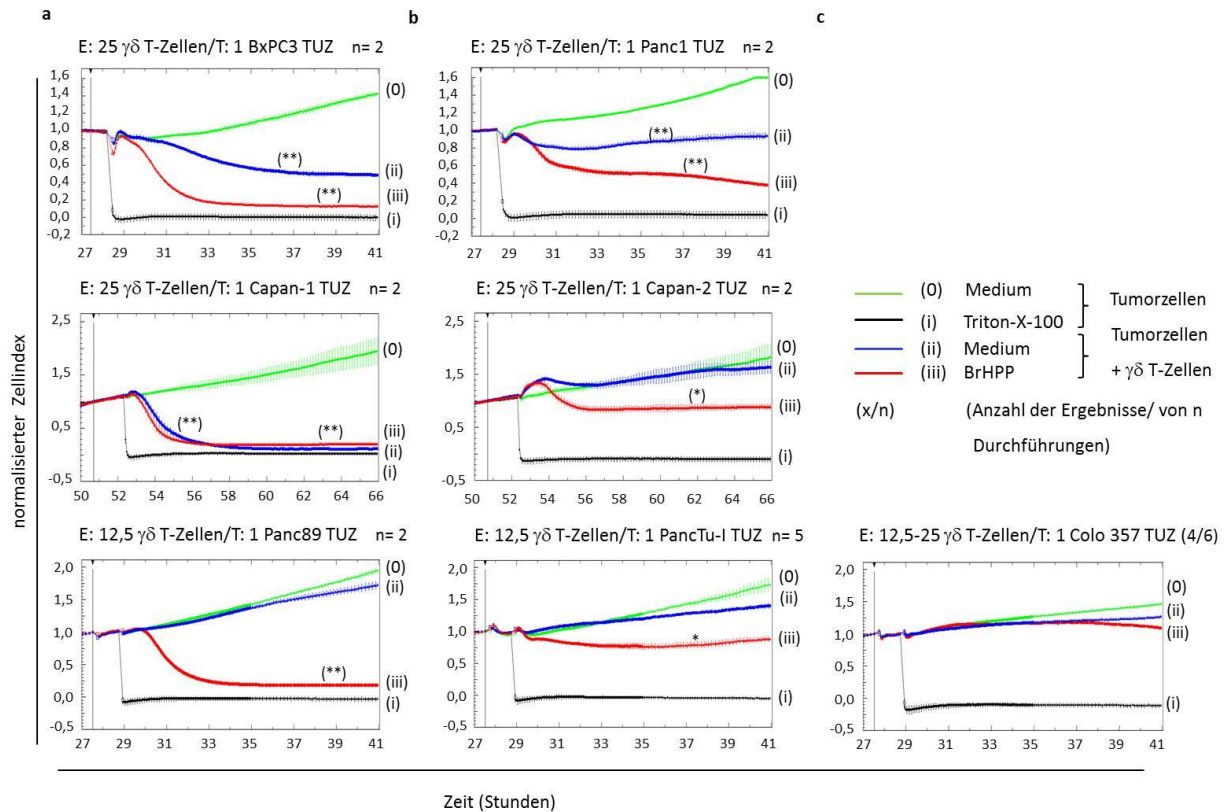
Zur Detektion eines Antikörpers gegen die IDO2 Isoform oder zur Detektion der Ladekontrolle mit Hilfe eines anti- $\beta$ -Actin oder anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Antikörpers auf derselben Membran wurde diese zunächst bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit 15 % (v/v)  $H_2O_2$  inkubiert. Hierbei soll die Peroxidase inaktiviert und die an den Proteinen gebundenen Antikörper gelöst und von der Membran entfernt werden. Nach drei Waschschritten mit TBS-T von je 5 Minuten wurde die Membran erneut für 45 Minuten in 5 % (w/v) Milchpulver geblockt und im Anschluss daran wieder für 10 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-IDO2 [in 5 % (w/v) Milchpulver], anti- $\beta$ -Actin (in TBS-T) oder anti-GAPDH (in TBS-T, Tabelle 6) geschah bei 4 °C rotierend über Nacht. Im Weiteren wurde so verfahren wie oben beschrieben. Als Sekundärantikörper wurden polyklonaler Schaf anti-Maus-POD Antikörper [mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBS-T] oder bei Primärinkubation gegen GAPDH polyklonaler Esel anti-Hase-POD Antikörper [mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBS-T] verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Sensitivitäten einzelner PDAC Zelllinien für die $\gamma\delta$ T-Zell vermittelte Lyse

Ein Fokus auf  $\gamma\delta$  T-Zellen in einer T-Zell-basierten Immuntherapie wird unter anderem mit ihrem MHC-Klasse I und II-unabhängigem zytotoxischen Potential gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorzellen begründet. Um weitere Eigenschaften, mögliche Regulationsmechanismen oder bereits bestehende Charakteristika ihres zytotoxischen Potentials genauer analysieren zu können, wurde im Rahmen vorliegender Arbeit ihre Zytotoxizität gegenüber PDAC Zellen mit Hilfe des xCELLigence (RTCA) Systems eingehender untersucht. Im Gegensatz zum  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest ermöglicht das xCELLigence die Analyse von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Interaktion mit Tumorzellen ohne Verwendung von Radioaktivität in Echtzeit. Die Aufzeichnung der Interaktion in minütlichen Intervallen ermöglicht die Messung einer intensiven Zeitkinetik (Abschnitt 3.2.3). Das mittelfristige Ziel ist die Gewinnung von zusätzlichen Erkenntnissen für den Einsatz der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Immuntherapie. Als Zielzellen wurden die PDAC Zelllinien BxPC3, Capan-1, Panc89, Panc1, Capan-2, PancTu-I und Colo357 in 96er E-Platten ausgesät. Nach initialer Adhärenz und Wachstumsphase von 27 bis 50 Stunden wurden mit BrHPP restimulierte und somit in ihrem zytotoxischen Potential aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinien im in Vorexperimenten ermittelten Effektor:Zielzell Verhältnis (E/T Ratio) von 12,5:1 oder 25:1 hinzugegeben und ihre Interaktion im weiteren Verlauf über mindestens 10 Stunden analysiert (Abbildung 1). Die PDAC Zellen konnten gegenüber der BrHPP (PAg) aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse in suszeptible (Abb. 1, Reihe a), nahezu (Abb. 1, Reihe b) und vollständig resistente (Abb. 1, Reihe c) Zelllinien unterteilt werden. BxPC3-, Capan-1- und Panc89 Zellen (Abb. 1, Reihe a) wurden innerhalb von vier Stunden stark lysiert [Abb. 1, rote Linien (iii)] verglichen mit der durch 1 % Triton-X-100 herbeigeführten maximalen Lysekapazität [Abb. 1, schwarze Linien (i)]. Es fiel zudem auf, dass die Tumorzelllinie Capan-1 auch in den Kontrollversuchen, in denen unstimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen zum Tumor gegeben worden sind, stark lysiert wurde,

wohingegen sich BxPC3 Zellen in den Kontrollversuchen nahezu und Panc89 Zellen vollständig resistent gegenüber einer Lyse von nicht restimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen in den ersten vier Stunden nach Zugabe der Lymphozyten zeigten [Abb. 1, blaue Linien der Reihe a, b (ii)].



**Abbildung 1: Lyse von (a) suszeptiblen, (b) nahezu und (c) vollständig resistenten PDAC Zelllinien.** 5000-12.500 Tumorzellen (TUZ) pro Vertiefung wurden in 96 Kavitäten E-Platten ausgesät. Die Zellen adhärten am Boden der Vertiefungen, die mit elektrischen Sensoren jeweilige Widerstände maßen und so Aussagen über das Zellwachstum zuließen. Als messbare Größe des Widerstandes wurde die willkürliche Skala des Zellindex übernommen. Außer im Fall der Wachstums- [grün, (0)] und der Positivkontrolle als Zeichen für die durch Triton-X-100 eingesetzte Maximallyse [schwarz, (i)], wurden nach der initialen Wachstumsphase  $\gamma\delta$  T-Zelllinien unterschiedlicher Spender, die mit 12,5 U/ml IL-2 versetzt worden waren, im E/T Ratio 12,5:1 oder 25:1 hinzugefügt und mit 300 nM BrHPP restimuliert [rot, (iii)] oder nicht [blau, (ii)]. Die Impedanz wurde nach anfänglicher Wachstumsphase zum Ausgleich kleiner Unterschiede in der Adhärenz an jeweilige Sensoren normalisiert und nach Zugabe der  $\gamma\delta$  T-Zellen zur möglichst präzisen Darstellung der Impedanz alle 3 Minuten in Triplikaten, deren Standardabweichung vom gezeigten Mittelwert in feinen senkrechten Linien hier dargestellt ist, gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der angegebenen Anzahl n, bzw. die Anzahl vergleichbarer Experimente (x) bei n Versuchsdurchführungen (x/n). Die Signifikanz der  $\gamma\delta$  T-Zellzytotoxizität im Medium oder nach BrHPP-Stimulation gegenüber den PDAC Zellen wurde im Vergleich zu den Tumorzellen ohne  $\gamma\delta$  T-Zellzugabe bestimmt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Student's t-Test. Die Signifikanzen sind dargestellt als P Wert; \* =  $P \leq 0,05$  und \*\* =  $P \leq 0,01$ . In zweifach durchgeführten Versuchen ist eine Tendenz der  $\gamma\delta$  T-Zellzytotoxizität beobachtet worden. Die Signifikanzberechnung wurde bei diesen Versuchen in Klammern gesetzt.

Panc1-, Capan-2- und PancTu-I Zellen (Abb. 1, Reihe b) bildeten die Gruppe der gegenüber einer Lyse in Anwesenheit von PAG nahezu resistenten PDAC Zelllinien. Hierbei war die Lyse zudem schwächer als in den Linien der Reihe a [Abb. 1, rote Linien (iii)], jedoch immer noch verstärkt gegenüber den Wachstumskontrollen [Abb. 1, grüne Linien, (0)]. Eine Lyse der

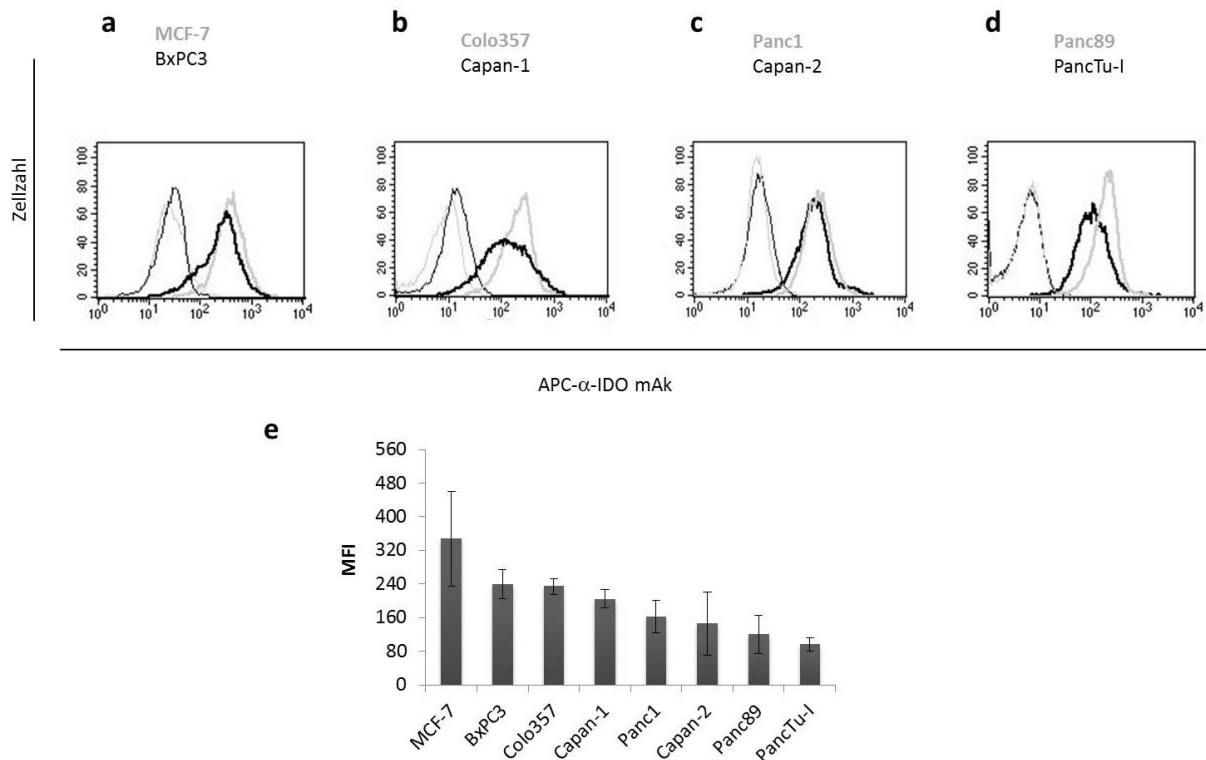
Tumorzellen durch nicht restimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen war in der Abb. 1, Reihe b in den ersten vier Stunden nach Zugabe der Lymphozyten kaum (Panc1 Zellen) bis überhaupt nicht (Capan-2- und PancTu-I Zellen) zu beobachten. Colo357 Zellen (Abb. 1, Reihe c) wurden sehr schwach lysiert. Nach 10 Stunden war der Zellindex von Colo357 Zellen [Abb. 1, rote Linie (iii)] kaum niedriger als der der Wachstumskontrolle [Abb. 1, grüne Linie (0)] und wurde somit als vollständig resistent gegenüber der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse bezeichnet. Diese Versuche wurden mit  $\gamma\delta$  T-Zelllinien unterschiedlicher gesunder Spender an unterschiedlichen Tagen nach Primärstimulation (dnPs) der Zellen (14-16 und 21 Tage nach Primärstimulation) mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Zusammengefasst lässt sich aus den Experimenten eine unterschiedliche Sensivität der PDAC Zellen gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse ableiten.

## 4.2 Intrazelluläre IDO Expression

### 4.2.1 Expression in PDAC Zellen

Die Expression von IDO in PDAC Zellen ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Witkiewicz et al. 2008; Witkiewicz et al. 2009). Die Möglichkeit einer Tumor-induzierten Überexpression von IDO in den schwer zu lysierenden Zelllinien könnte ein Resistenzmechanismus gegenüber der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Tumorzelllyse darstellen und ist im Weiteren untersucht worden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Expression des Enzyms mit Hilfe des APC-markierten anti-IDO mAk durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 2 ist die mittlere Fluoreszenzintensität der intrazellulären IDO Expression sieben unterschiedlicher PDAC Zelllinien vergleichend mit der Brustkrebszelllinie MCF-7, die als Positivkontrolle diente, dargestellt. Die Histogramme (Abb. 2 a-d) stellen repräsentative Einzelergebnisse der Linien MCF-7 und BxPC3 (a), Colo357 und Capan-1 (b), Panc1 und Capan-2 (c), sowie Panc89 und PancTu-I (d) dar. In Abb. 2 e ist der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der IDO Expression mehrerer Experimente abgebildet. Die Intensität der IDO Expression in der Graphik Abb. 2 e nimmt von links nach rechts ab, beginnend mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 als Positivkontrolle (348 MFI), folgend die PDAC

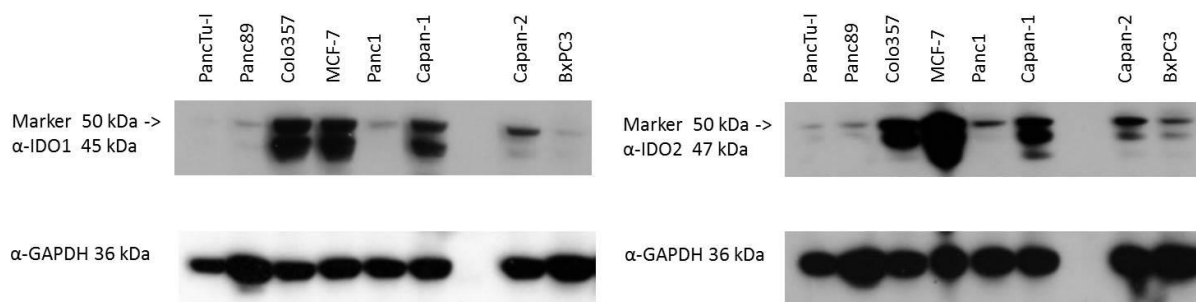
Zelllinien BxPC3 (239 MFI), Colo357 (234 MFI) und Capan-1 (204 MFI), über Panc1 (163 MFI), Capan-2 (146 MFI), Panc89 (119 MFI) bis hin zu PancTu-I (96 MFI).



**Abbildung 2: Intrazelluläre Expression von IDO.** Die Expression wurde in den dargestellten Tumorzelllinien gemessen und mit APC-anti-IDO mAk (700383, R&D Systems, 1  $\mu$ g/ml) am FACS Calibur mit Hilfe der CellQuestPro Software bestimmt. (a-d) Die Histogramme stellen repräsentative Einzelergebnisse dar. Die dünne Linie repräsentiert jeweils die Isotypkontrolle, dicke Linien die IDO Expression. Die Farbcodierung der Schriftfarben entspricht der Darstellung der Histogramme. (e) Die Balkendiagramme stellen Mittelwerte der IDO Expression (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) der dargestellten TUZ aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung dar.

Um die IDO Expression zu verifizieren, wurden die Ergebnisse mit Hilfe von Western Blot Analysen überprüft. Es wurden Western Blot taugliche anti-IDO1, -IDO2 mAk und der anti-GAPDH mAk als Ladekontrolle verwendet. Die GAPDH Expression war verstärkt bei Panc89-, Capan-2- sowie BxPC3 Zellen, was auf einen höheren Proteingehalt dieser Proben hindeutet. Im Unterschied zur durchflusszytometrischen Analyse wurde im Western Blot kein pan anti-IDO mAk, sondern anti-IDO1 und -IDO2 mAk verwendet. Im Western Blot war die vermehrte Expression von IDO1 und 2 bei den Zelllinien MCF-7, Colo357 und Capan-1 sichtbar (Abbildung 3). Bei der Zelllinie BxPC3 konnte hingegen keine Expression von IDO1 und nur

eine sehr schwache Expression von IDO2 gesehen werden. Beide Isoformen (IDO1/2) wurden zudem in Capan-2 Zellen schwächer als in den erstgenannten Linien exprimiert. IDO1 und 2 wurden ebenfalls in einem geringen Maß in der Zelllinie Panc1 nachgewiesen. Vergleichend zur Positivkontrolle in Form der Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte die stärkste Expression von IDO in den PDAC Zelllinien Colo357 und Capan-1 detektiert werden. Lässt man Colo357 Zellen außer Betracht, bei welchen eine vermehrte Expression von Cyclooxygenase 2 (COX2) die Resistenz verursacht, dann ergab sich eine Tendenz, dass eine verminderte Expression von IDO1 eher zu einer Resistenz führen würde (Gonnermann et al. 2015). Inwiefern die IDO1 Expression jedoch möglicherweise durch Zytokine moduliert wird, welche durch  $\gamma\delta$  T Zellen nach Interaktion mit Tumorzellen produziert werden, wurde im Folgenden untersucht.

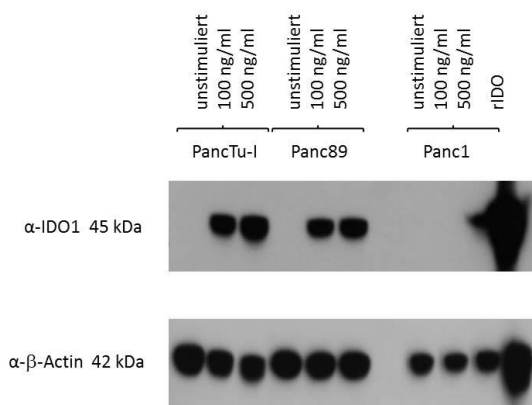


**Abbildung 3: IDO Expression unterschiedlicher Tumorzelllinien.** Die Expression von IDO1 und IDO2 wurde in den dargestellten PDAC Zelllinien sowie einer Brustkrebszelllinie (MCF-7) als Positivkontrolle detektiert. Nach 24 stündiger Kultivierungsphase und Zellyse mittels TNE Lyse Puffer erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford. Je 10  $\mu\text{g}$  Protein wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, mit anti-IDO1 mAk (1A3, OriGene Technologies, 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder anti-IDO2 mAk (1A4, OriGene Technologies, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert und mit Peroxidase-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper (1:7500) detektiert. Zur Detektion der GAPDH Ladekontrolle wurden die Antikörper mit 15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  inaktiviert und der Blot mit anti-GAPDH mAk (6C5, R&D Systems, Bio-Techne, 1:10000) und Esel anti-Hase Antikörper (1:7500) inkubiert. Die Abbildung zeigt einen von zwei durchgeführten Versuchen.

#### 4.2.2 IDO Expression in PDAC Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$

Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, dass die Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vermittelte Stimulation von IDO in einigen menschlichen Tumorzellen *in vitro* zu vermehrtem Tryptophan Abbau führt (Ozaki et al. 1988). Daher wurde die Wirkung des auch von aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen

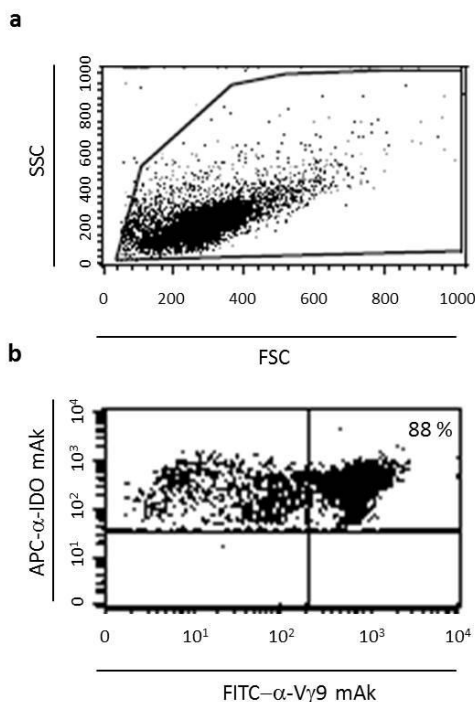
freigesetzten Zytokins IFN- $\gamma$  auf die IDO Expression von PDAC Zelllinien näher untersucht. So könnte beispielsweise eine Zunahme der intrazellulären IDO1 Expression nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in PancTu-I- und Panc89 Zellen eine Erklärung für die *per se* (im Medium) schwache  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse sein. Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte mit Hilfe einer weiteren Western Blot Analyse (Abbildung 4). Zum Vergleich wurden Colo357 Zellen verwendet, die *per se* viel IDO1 exprimieren und Panc1 Zellen, bei welchen sich durch IFN- $\gamma$  kein IDO1 induzieren ließ. Als Ladekontrolle wurde der mAk anti- $\beta$ -Actin verwendet sowie rekombinantes IDO als Positivkontrolle. Der Nachweis von IDO erfolgte mit anti-IDO1 mAk bei 45 kDa. Bei keiner der Zelllinien PancTu-I, Panc89 oder Panc1 konnte IDO1 ohne Stimulation durch IFN- $\gamma$  sichtbar nachgewiesen werden. Nach Kultivierung der PancTu-I- und Panc89 Zellen mit 100-500 ng/ml IFN- $\gamma$  konnte IDO1 detektiert werden. Durchflusszytometrisch konnte eine Zunahme der IDO Expression nach Markierung mit APC-markiertem pan anti-IDO mAk in IFN- $\gamma$  stimulierten Tumorzelllinien nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4: Veränderung der IDO Expression durch Stimulation mit IFN- $\gamma$ .** Die Expression von IDO1 mittels Western Blot Analyse wurde in den dargestellten PDAC Zelllinien detektiert. Nach 48 stündiger Kultivierungsphase entweder unstimuliert, mit 100 ng/ml oder 500 ng/ml IFN- $\gamma$  stimuliert und anschließender Zellyse mittels TNE Lyse Puffer, erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford. Je 10  $\mu$ g Protein wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde mit anti-IDO1 mAk (1A3, OriGene Technologies, 0,5  $\mu$ g/ml) inkubiert und der Antikörper mittels Peroxidase-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper (1:7500) detektiert. Zur Analyse der  $\beta$ -Actin Ladekontrolle wurde mit 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert und der Blot mit anti- $\beta$ -Actin mAk (AC 15, Sigma, 1:5000) und polyklonalem Schaf anti-Maus Antikörper (1:7500) inkubiert. Rekombinantes IDO (rIDO) fungierte als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt repräsentativ einen von zwei durchgeführten Versuchen.

### 4.2.3 IDO Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen

Eine intrazelluläre Expression von IDO in  $\gamma\delta$  T-Zellen würde dem natürlichen Tryptophan Katabolismus entsprechen. Daher wurde nebst der intrazellulären Expression von IDO in PDAC Zellen auch die Expression in  $\gamma\delta$  T-Zellen quantifiziert. Zur Erläuterung der Messung und Auswertung der gewonnenen Daten in den zu untersuchenden Zellen ist in Abbildung 5 die Vorgehensweise beispielhaft für einen Spender dargestellt. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen an Tag 16 nach Primärstimulation wurden zunächst nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) im Streulicht analysiert (Abb. 5 a). In einem weiteren Punktwolkendiagramm (Abb. 5 b) ist die prozentuale Verteilung der  $V\gamma 9^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen gezeigt, die mit FITC-markiertem anti- $V\gamma 9$  mAk auf der Oberfläche, gefolgt von einer intrazellulären Markierung mit APC-markierten pan anti-IDO mAk untersucht wurden. Nicht abgebildet sind die negativen Isotypenkontrollen. Zu sehen ist, dass 88 % der Zellen  $V\gamma 9$  und IDO positiv waren (rechte Quadranten in Abb. 5 b).



**Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären IDO Expression von  $\gamma\delta$  T-Zellen.** Die kombinierte Oberflächenmarkierung von FITC-anti- $V\gamma 9$  mAk (20  $\mu$ l/ml) und intrazelluläre Markierung von APC-anti-IDO mAk (700383, R&D Systems, 1  $\mu$ g/ml) wurde am FACS Calibur mit Hilfe der CellQuestPro Software analysiert. In (a) ist gezeigt, wie die Lymphozyten anhand der Streulichtanalyse (FSC und SSC) identifiziert worden sind. Daraufhin wurden die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten innerhalb der Zellpopulation durch Bestimmung von FITC-anti- $V\gamma 9$  mAk und APC-anti-IDO mAk abgegrenzt und ihre IDO Expression prozentual analysiert (b). Exemplarische Abbildung eines von zwei Versuchen.



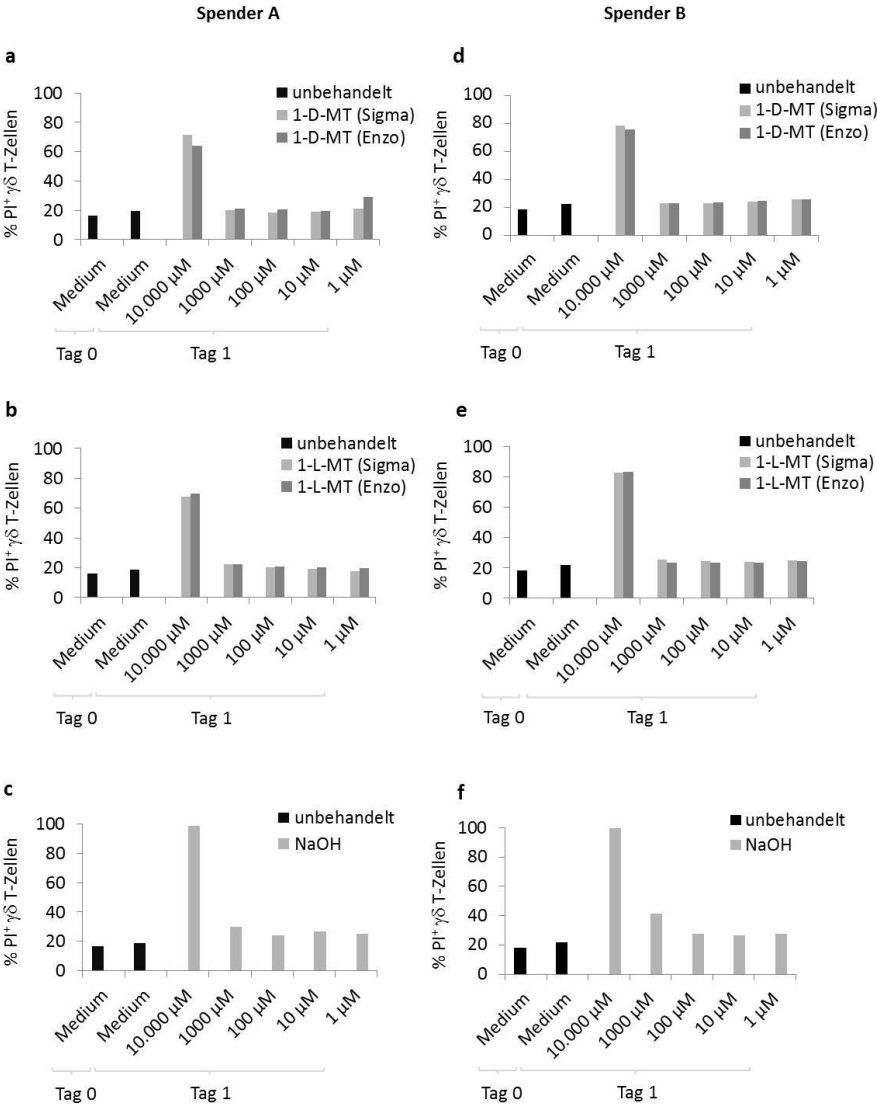
## 4.3 Behandlung der PDAC Zellen mit verschiedenen IDO Inhibitoren

IDO1 und 2 sowie TDO bilden Schlüsselenzyme des Tryptophanabbaus, indem sie durch Addition von Sauerstoff die Reaktion von Tryptophan zu N-Formylkynurenin katalysieren. Um die Verfügbarkeit von Tryptophan für zum Beispiel Krebszellen einzuschränken, könnte die Inhibition von IDO1/2 und TDO ein geeigneter Mechanismus zur Reduktion IDO vermittelter Effekte wie einer verminderten T-Zell Immunantwort sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden vier unterschiedliche Inhibitoren benutzt: Indoximod oder auch 1-Methyl-D-Tryptophan (1-D-MT), ein IDO und TDO Inhibitor, dessen Stereoisomer 1-Methyl-L-Tryptophan (1-L-MT), das kompetitiv IDO1 hemmt, Tenatoprazol, ein IDO2 und Protonenpumpen Inhibitor, sowie 680C91, ein TDO Inhibitor (Witkiewicz et al. 2009; Austin et al. 2015).

### 4.3.1 Einfluss der IDO Inhibitoren auf den Zelltod von PDAC- und $\gamma\delta$ T-Zellen

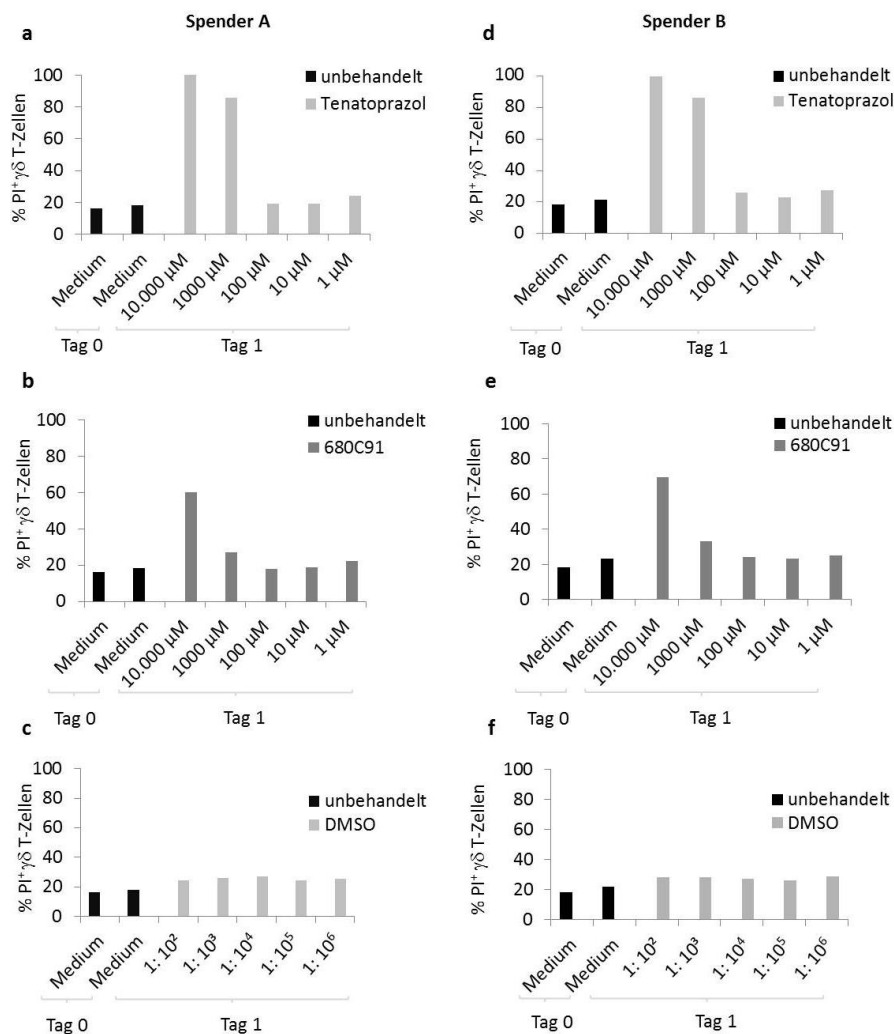
IDO ist ein Enzym, das in moderaten Konzentrationen in allen Gewebetypen exprimiert wird. Bevor IDO Inhibitoren in der Interaktion zwischen PDAC- und  $\gamma\delta$  T-Zellen eingesetzt wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit ihre konzentrationsabhängigen toxischen Effekte auf die Induktion von Zelltod in den Zellen *per se* untersucht. Ziel war es, eine Aussage über mögliche Einsatzkonzentrationen der Inhibitoren treffen zu können. Es wurden die in der Literatur häufig verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren sowie die der verwendeten Lösungsmittelkontrollen NaOH und DMSO in Zehnerpotenzen mit Konzentrationen zwischen 10 mM und 1  $\mu$ M NaOH bzw. 1:10<sup>2</sup> bis 1:10<sup>6</sup> DMSO verglichen. Zur Ermittlung des Prozentsatzes Propidiumiodid (PI) positiver und somit toter  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden die Lymphozyten für 24 Stunden mit der jeweiligen Substanz kultiviert. Anhand der PI bedingten Interkalation konnte während der darauffolgenden Messung der Prozentsatz PI positiver  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten festgestellt werden. Vergleichend wurden auch Kontrollmessungen unbehandelter Zellen an Tag 0 und Tag 1 durchgeführt. Zur Erläuterung der Auswertung der

durchflusszytometrischen Daten PI positiver Markierung sind in den Abbildungen 6 und 7 die Effekte der vier verwendeten IDO Inhibitoren graphisch für zwei Spender dargestellt. Die Werte lassen eine Aussage über die Höhe der für  $\gamma\delta$  T-Zellen toxischen Konzentration der verschiedenen Inhibitoren zu. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, zeigen die mit 10 mM 1-D-MT, 1-L-MT oder NaOH inkubierten Kulturen einen gesteigerten Prozentsatz PI positiver Zellen von circa 64 %. Im Unterschied zu 22 % PI positiven Zellen bei einer Einsatzkonzentrationen von 1 mM. Dies war unabhängig von welchem Unternehmen (Enzo oder Sigma) die Inhibitoren stammten und in der Konzentration von 1mM vergleichbar mit Werten der Kontrollmessungen (ca. 22 %  $PI^+$  in Medium, ca. 25 %  $PI^+$  in NaOH).



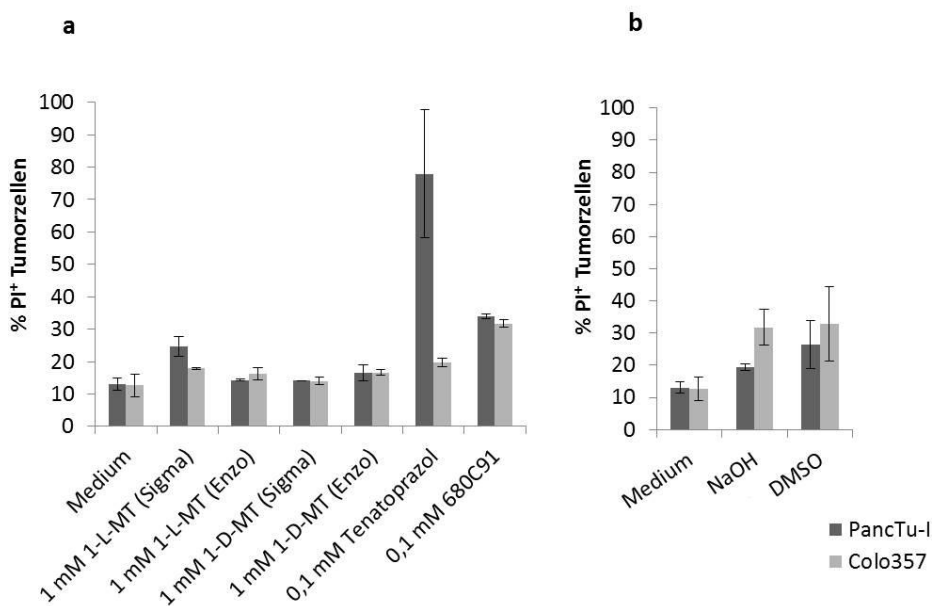
**Abbildung 6: Effekte von IDO Inhibitoren auf den Zelltod von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten.** Dargestellt ist der Einfluss von (a, d) 1-D-MT (Sigma und Enzo), (b, e) 1-L-MT (Sigma und Enzo) und entsprechender Lösungsmittelkontrolle (c, f) NaOH auf den Zelltod von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten Linien. Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wurden für 24 Std. mit den Substanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PI (Serva, 2 $\mu$ g/ml) markiert und die Interkalation durchflusszytometrisch an einem FACS Calibur bestimmt. Eine Analyse an Tag 0 vor der Inkubation der Zellen sowie Kontrollmessungen unbehandelter Zellen an Tag 1 sind in schwarz zu sehen. Zur Analyse wurde die CellQuestPro Software benutzt. Dargestellt sind die Ergebnisse beider Spender (A: a-c und B: d-f) bei zwei durchgeführten Versuchen.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass mit zunehmender Konzentration der Inhibitoren bzw. des Lösungsmittels ein zunehmender Prozentsatz PI positiver Lymphozyten festgestellt werden konnte. Lymphozyten, welche mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO inkubiert wurden, zeigten stets einen geringfügig gesteigerten Prozentsatz PI positiver Lymphozyten (ca. 25 % PI<sup>+</sup>) im Vergleich zu in Medium kultivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen (Abbildung 7). Wurden die Kulturen mit Tenatoprazol oder 680C91 inkubiert, so zeigte sich bei Konzentrationen bis maximal 0,01 mM Tenatoprazol (ca. 23 % PI<sup>+</sup>) bzw. 0,1 mM 680C91 (ca. 30 % PI<sup>+</sup>) eine geringfügig gesteigerte Toxizität der Substanzen. Mit zunehmender Konzentration beider IDO Inhibitoren konnte auch hier ein zunehmender Prozentsatz PI positiver Lymphozyten festgestellt werden.



**Abbildung 7: Effekte von IDO Inhibitoren auf den Zelltod von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten.** Dargestellt ist der Anteil PI<sup>+</sup> Zellen in unbehandelten (schwarze Balken an Tag 0 und 1) und in mit (a, d) Tenatoprazol (abcam), (b, e) 680C91 (Tocris) und entsprechender Lösungsmittelkontrolle (c, f) DMSO behandelten Zellen auf den Zelltod von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten Linien. Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wurden für 24 Std. mit den Substanzen in den dargestellten Konzentration bzw. Verdünnungsfaktoren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PI (Serva, 2 $\mu$ g/ml) markiert und die Interkalation durchflusszytometrisch am FACS Calibur bestimmt und mit der CellQuestPro Software analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 Spendern (A: a-c und B: d-f) bei zwei durchgeführten Versuchen.

Außerdem wurde der Einfluss der Inhibitoren auf den Zelltod der Tumorzelllinien PancTu-I und Colo357 untersucht (Abbildung 8). Verglichen wurde die Prozentzahl PI positiver Tumorzellen im Medium mit Tumorzellen, die für 24 Std. mit den verschiedenen Inhibitoren kultiviert wurden. 1-D-MT und 1-L-MT sowohl von der Firma Enzo als auch von der Firma Sigma wurden ebenso wie das Lösungsmittel NaOH in einer 1 mM Konzentration verwendet. Tenatoprazol und 680C91 wurden in 0,1 mM Lösung verwendet, sowie DMSO mit einem Verdünnungsfaktor von 1:1000.



**Abbildung 8: Zelltod von PancTu-I und Colo357 Zellen unter Einfluss verschiedener IDO Inhibitoren.** (a) Dargestellt ist der Einfluss von 1 mM 1-L-MT (Sigma und Enzo), 1 mM 1-D-MT (Sigma und Enzo), 0,1 mM Tenatoprazol (abcam) und 0,1 mM 680C91 (Tocris). (b) Als Lösungsmittelkontrollen wurden NaOH (1 mM) und DMSO (Verdünnungsfaktor 1: 10<sup>3</sup>) verwendet. Die Tumorzellen wurden für 24 Std. mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PI (Serva, 2µg/ml) markiert und die Interkalation durchflusszytometrisch am FACS Calibur bestimmt. Zur Analyse wurde die CellQuestPro Software benutzt. Die Balkendiagramme stellen Mittelwerte aus 2-fach Werten eines Experiments mit Standardabweichung dar (a und b).

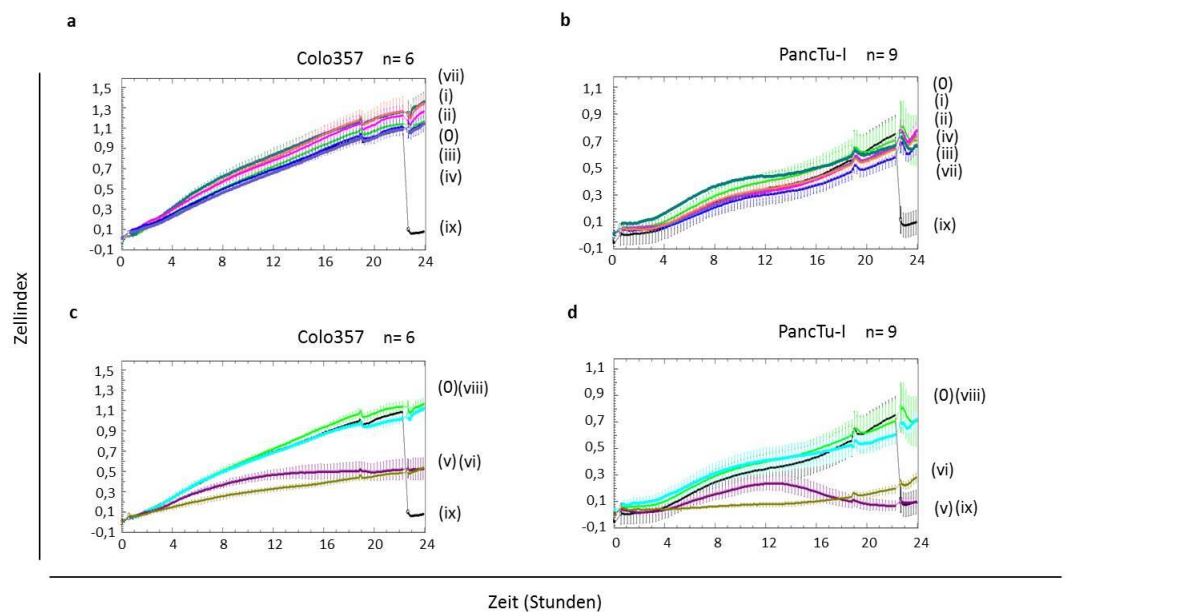
Hierbei wies die Tumorzelllinie PancTu-I unter Einfluss der Inhibitoren 1-L-MT, 1-D-MT und NaOH in jeweils 1 mM Konzentration verglichen mit den Werten der Kontrollmedien (ca. 13 % PI<sup>+</sup>) eine geringfügige Erhöhung des Prozentsatzes PI positiver Zellen auf (zwischen 14 und 19 % PI<sup>+</sup>). Im Gegensatz dazu konnte ein mit 78 % stark stark erhöhter Prozentsatz toter PancTu-I Zellen nach Zugabe von Tenatoprazol festgestellt werden, sowie die deutlich

erhöhten Prozentsätze PI positiver PancTu-I Zellen nach Zugabe von 680C91 (ca. 34 % PI<sup>+</sup>) und DMSO (ca. 26 % PI<sup>+</sup>). Die Tumorzelllinie Colo357 zeigte ebenfalls unter Zugabe von Tenatoprazol (ca. 19 % PI<sup>+</sup>), 680C91 und DMSO (Verdünnungsfaktor 1:1000), aber auch bei Verwendung von NaOH erhöhte Werte PI positiver Zellen (ca. 30 % PI<sup>+</sup>). Unter Einfluss von 1-D-MT und 1-L-MT wurden geringfügige Erhöhungen des Prozentsatzes PI positiver Zellen (ca. 14-19 % PI<sup>+</sup>) verglichen mit den Werten der Kontrollmedien festgestellt. In nachfolgenden Experimenten zur Messung der Impedanz wurden die Konzentrationen mit geringfügigen toxischen Effekten der IDO Inhibitoren verwendet.

### **4.3.2 Mögliche Beeinflussung des Zellwachstums durch IDO Inhibitoren**

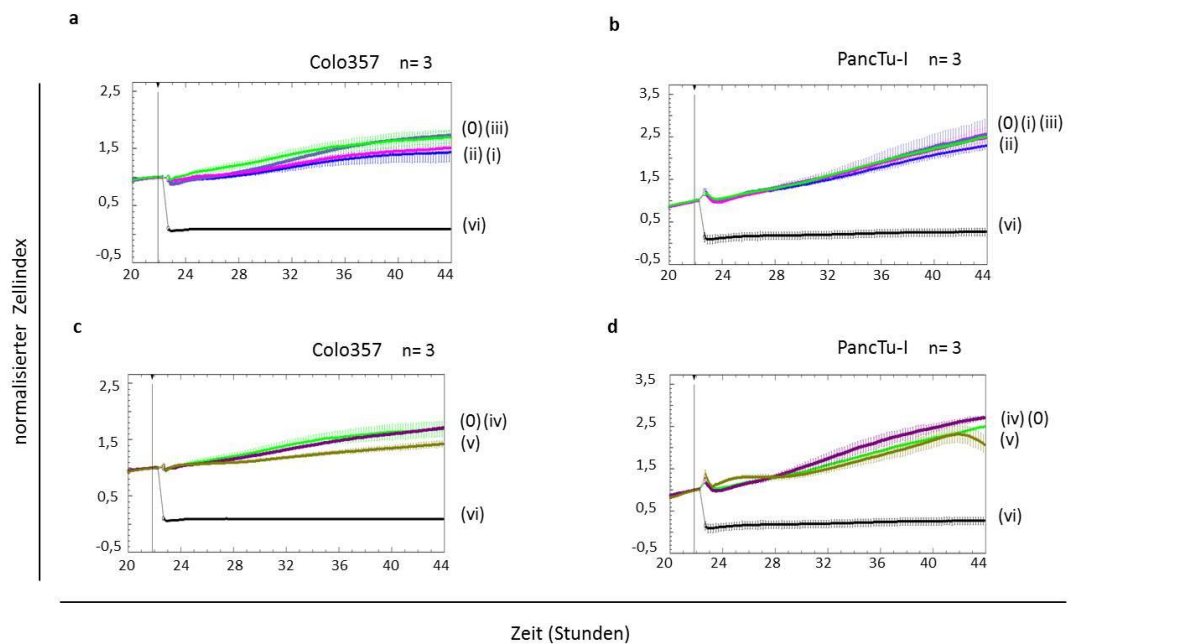
Nach Austestung der toxischen Effekte, war es von Interesse die Veränderung des Adhäsionsvermögens der Tumorzellen in An- bzw. Abwesenheit von  $\gamma\delta$  T-Zellen unter Einfluss der verschiedenen IDO Inhibitoren mit Hilfe des RTCA zu untersuchen. Zur Überprüfung einer Beeinflussung der Impedanz und somit des messbaren Zellwachstums wurden pro Vertiefung 7500 PDAC Zellen Colo357 und PancTu-I in 96er E-Platten ausgesät. In Abbildung 9 ist eine 24 stündige Anwachsphase der Tumorzellen entweder in Medium allein (0) oder unter Einfluss unterschiedlicher und in der Legende von Abb. 9 angegebener IDO Inhibitoren dargestellt. Als Lösungsmittelkontrolle dieser Substanzen wurde 1 mM NaOH (vii) oder DMSO verwendet (viii). Nach initialer Zugabe von 1mM 1-D-MT der Firma Sigma (i) oder Enzo (ii) zu Colo357- oder PancTu-I Zellen zeigte sich keine Veränderung des Zellindex gegenüber den nur in Medium (0) anwachsenden Tumorzellen (Abb. 9 a, b). Nach initialer Zugabe von 1mM 1-L-MT der Firma Sigma (iii) oder Enzo (iv) zu Colo357- oder PancTu-I Zellen konnte ein minimal verminderter Zellindex gegenüber den nur in Medium (0) anwachsenden Tumorzellen (Abb. 9 a, b) beobachtet werden. Wurde 0,1 mM Tenatoprazol (v) oder 0,1 mM 680C91 (vi) hinzugegeben, wurde bei beiden PDAC Zellen ein Abfall des Zellindex um ca. 50 % verglichen mit der Wachstumskontrolle (0) und der durch 1 % Triton-X-100 herbeigeführten maximalen Lysekapazität (ix) festgestellt (Abb. 9 c, d). Somit führte

der Einsatz von Tenatoprazol und 680C91 in der Anwachsphase der Tumorzellen zu einer Abschwächung des Zellwachstums.



**Abbildung 9: Vermindertes Wachstum von Colo357 und PancTu-I Zellen unter Einfluss von Tenatoprazol und 680C91 in der Anwachsphase.** Dargestellt ist eine 24 stündige Wachstumsphase der Tumorzellen der Linien (a, c) Colo357 und (b, d) PancTu-I im RTCA. Mit Aussäen von 7500 Tumorzellen/Vertiefung wurden entweder 1 mM 1-D-MT der Firmen Sigma [orange, (i)] oder Enzo [pink, (ii)] oder 1 mM 1-L-MT der Firmen Sigma [blau, (iii)] oder Enzo [violett, (iv)] hinzugefügt (a, b). Als Lösungsmittelkontrolle dieser Substanzen wurde 1 mM NaOH [dunkelgrün, (vii)] verwendet. Auch Tenatoprazol [abcam, lila, (v)] und 680C91 [Tocris, olivgrün, (vi)] wurden in 0,1 mM Konzentrationen hinzugefügt und in für sich stehenden Graphiken abgebildet (c, d). Hier fungierte DMSO (1:1000 verdünnt) als Lösungsmittelkontrolle [hellblau, (viii)]. Die Wachstums- und die durch Triton-X-100 vermittelte Positivkontrolle der maximalen Lysekapazität (Zugabe in Stunde 23) sind in hellgrün (0) bzw. schwarz (ix) gezeigt. Die jeweils in Triplikaten gemessenen Zellindizes werden als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung abgebildet. Dargestellt ist der nach anfänglicher Wachstumsphase normalisierte und im abgebildeten Zeitintervall alle 3 Minuten erfasste Zellindex einer repräsentativen Messung der angegebenen Anzahl (n).

Wurden 7500 Tumorzellen/Vertiefung der PDAC Zellen Colo357 oder PancTu-I nach der 24 stündigen Anwachsphase in Abb. 9 mit 1 mM 1-D-MT der Firma Enzo (i) oder 1 mM 1-L-MT der Firmen Enzo (iii) oder Sigma (ii) inkubiert, konnte ein minimaler Verlust der Impedanz nach Normalisierung des Zellindex zur Synchronisation des unterschiedlichen Anwachsens der Zellen festgestellt werden (Abbildung 10 a, b). 0,1 mM Tenatoprazol (iv) und 0,1 mM 680C91 (v) induzierten ebenso nach Normalisierung einen schwachen Verlust der Impedanz von Colo357 und PancTu-I Zellen (Abbildung 10 c, d). Bei PancTu-I trat ein Abfall des normalisierten Zellindex nach ca. 43 Stunden auf (Abbildung 10 d).



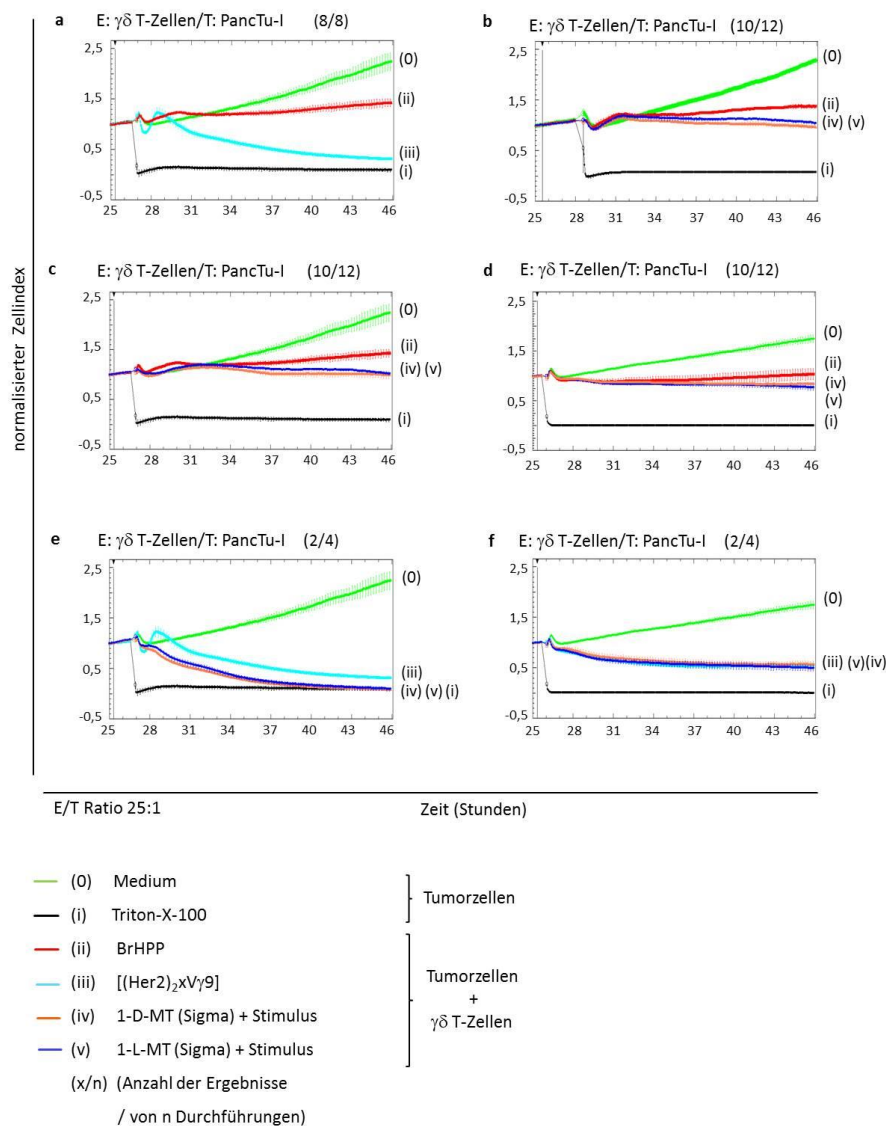
**Abbildung 10: IDO Inhibitoren beeinflussen das Wachstum von Colo357 und PancTu-I Zellen nach der Anwachsphase nicht.** 7500 Tumorzellen/Vertiefung von (a, c) Colo357 oder (b, d) PancTu-I wurden in 96 Kavitäten E-Platten ausgesät. Nach einer ca. 24 stündigen Anwachsphase wurden den Tumorzellen außer in der Wachstumskontrolle [hellgrün, (0)] und der durch Triton-X-100 vermittelten Maximallysekapazität [schwarz, (vi)], entweder 1 mM 1-D-MT Firma Enzo [pink, (i)] oder 1 mM 1-L-MT der Firmen Sigma [blau, (ii)] oder Enzo [violett, (iii)] hinzugefügt (a, b). Auch Tenatoprazol [abcam, lila, (iv)] und 680C91 [Tocris, olivgrün, (v)] wurden in 0,1 mM Konzentrationen hinzugefügt und sind in eigenständigen Bildern gezeigt (c, d). Die jeweils in Triplikaten gemessenen Zellindizes werden als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung abgebildet. Dargestellt ist der nach anfänglicher Wachstumsphase normalisierte und im abgebildeten Zeitintervall alle 3 Minuten erfasste Zellindex einer repräsentativen Messung der angegebenen Anzahl (n).

- |   |   |                  |
|---|---|------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>(0) Medium</li> <li>(i) 1-D-MT (Enzo)</li> <li>(ii) 1-L-MT (Sigma)</li> <li>(iii) 1-L-MT (Enzo)</li> <li>(iv) Tenatoprazol</li> <li>(v) 680C91</li> <li>(vi) Triton-X-100</li> </ul> | } | Tumor-<br>zellen |
|---|---|------------------|

Es lässt sich zusammenfassen, dass Tenatoprazol und 680C91 bei Versuchen mit dem RTCA das Wachstum von Colo357- und PancTu-I Zellen in Abhängigkeit des Zeitpunkts ihrer Anwendung beeinflussten, insbesondere in der 24 stündigen Anwachsphase der Tumorzellen. Im Vergleich zu 1-D/L-MT inhibierten sie das Wachstum der Tumorzellen dabei wesentlich stärker und schwächten es auf bis zu 50 % des Zellindex der Kontrolle ab. Auf Grund dieser Beeinflussung der Impedanz *per se* und somit der Proliferation von Tumorzellen wurde bei weiteren Versuchen in der Interaktion mit  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem RTCA auf Vorinkubation mit Tenatoprazol und 680C91 verzichtet.

### 4.3.3 Veränderung der $\gamma\delta$ T-Zell vermittelten Lyse einzelner PDAC Zellen

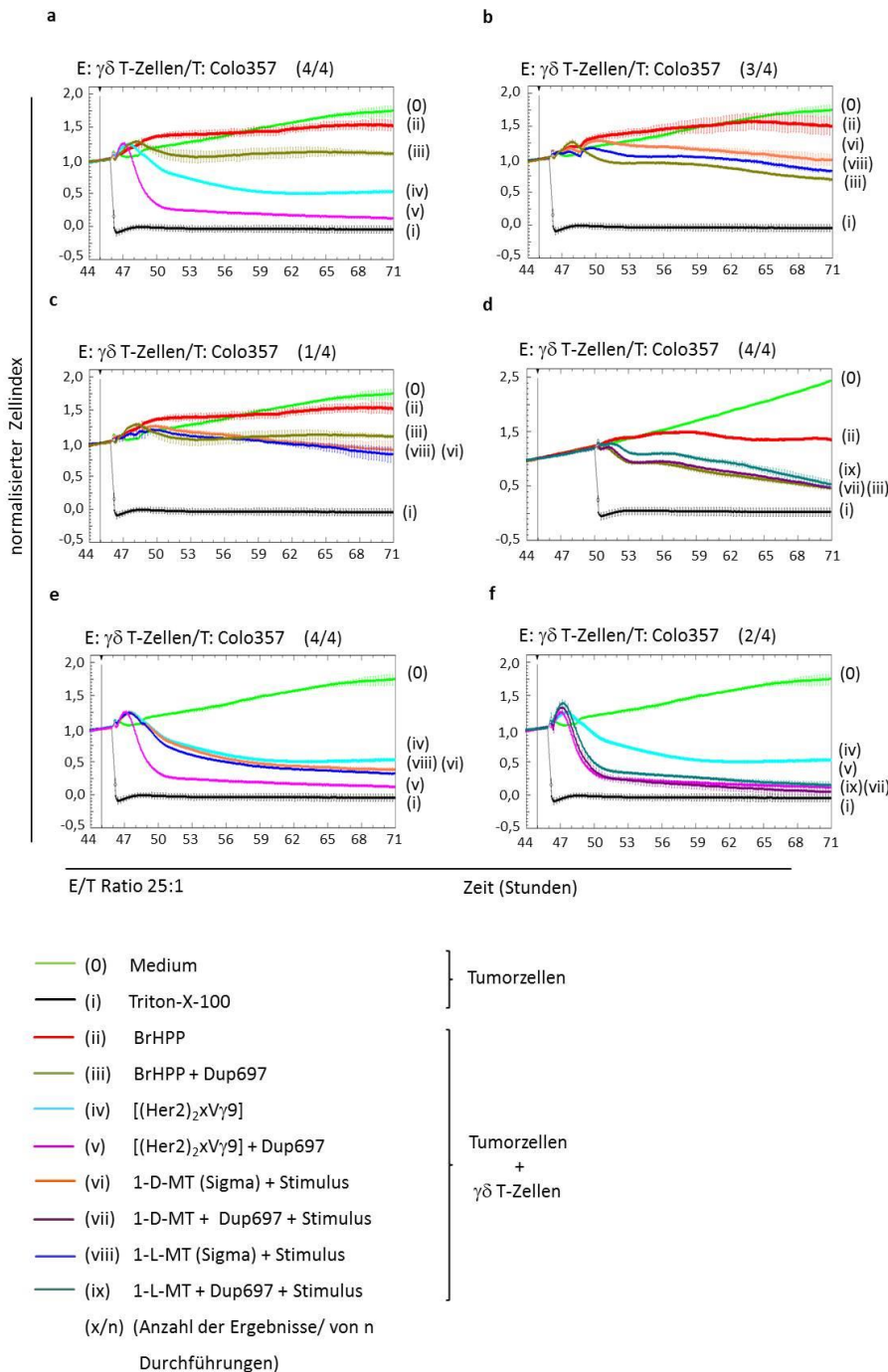
In drauf folgenden Versuchen wurde die zytotoxische Kapazität der  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber PDAC Zellen eingehender untersucht. Mit Hilfe des RTCA wurden potentielle Regulationsmechanismen der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse gegenüber resistenten PDAC Zelllinien in Anwesenheit von IDO1 Inhibitor 1-L-MT sowie dessen Stereoisomer 1-D-MT getestet. Zu diesem Zweck wurden die gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse nahezu und vollständig resistenten Zelllinien PancTu-I und Colo357 mit je 5000-7500 Tumorzellen pro Kavität in 96er E-Platten ausgesät und mit Medium, 1mM 1-D-MT oder 1-L-MT kultiviert.





Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, wurde nach einer ca. 25 stündigen Wachstumsphase der PancTu-I Zellen und Erreichen eines Zellindex von nahezu 1, entweder mit 1 µg/ml des *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xVγ9] (Abb. 11 a, e, f, hellblau) oder 300 nM des PAgS BrHPP (Abb. 11 a-d, rot) restimulierte γδ T-Zelllinien im E/T Verhältnis von 25:1 hinzugefügt und die Lyse der PDAC Zellen ca. 24 Stunden analysiert. Die Lysefähigkeit der mit dem *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xVγ9] stimulierten γδ T-Zellen übertraf wie zu erwarten die der mit BrHPP stimulierten in allen Fällen (Abb. 11 a). Eine zusätzlich gesteigerte Lysefähigkeit der mit dem *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xVγ9] stimulierten γδ T-Zellen durch Zugabe eines IDO Inhibitors unabhängig des verwendeten Stereoisomers konnte hier in 2 von 4 Fällen beobachtet werden (Abb. 11 e, f). In Abbildung 11 b, c und d ist zu sehen, dass PancTu-I Zellen bei Zugabe von BrHPP und einem IDO Inhibitor (iv, v) besser lysiert wurden als in den Kontrollen der mit BrHPP allein stimulierten γδ T-Zellen (iii). Dieser Effekt wurde nach 15 stündiger Inkubation der Lymphozyten mit den Tumorzellen (etwa Stunde 40) in 10 von 12 Versuchen beobachtet.

Wurden Zellen der vollständig resistenten PDAC Zelllinie Colo357 als Zielzellen benutzt, so wurde auch hier die Lysefähigkeit der mit dem *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xVγ9] stimulierten γδ T-Zellen gegenüber BrHPP in 4 von 4 Fällen verstärkt (Abbildung 12 a). Durch Präinkubation der Tumorzellen mit einem IDO Inhibitor unabhängig des Stereoisomers 1-L/D-MT konnte hier in 4 von 4 Fällen eine weitere Verminderung des Zellindex beobachtet werden (Abb. 12 e: iv, vi, viii). Am stärksten wurde die Lysefähigkeit der mit dem *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xVγ9] stimulierten γδ T-Zellen bei Präinkubation der Tumorzellen mit 50 µM des COX2 Inhibitor Dup697 allein (v) oder bei gleichzeitiger Zugabe von 1-L/D-MT (ix, vii) gesteigert (f jeweils 2 von 4 Fällen). Der COX2 Inhibitor Dup697 wurde zusätzlich verwendet, da in Vorarbeiten der Gruppe beobachtet wurde, dass die Blockade von COX2 in Colo357 Zellen zu deren verbesserter Lyse durch γδ T-Zellen führte (Gonnermann et al. 2015). Bei den mit BrHPP stimulierten γδ T-Zellen wurde ebenfalls eine Abnahme des Zellindex bei Präinkubation der Colo357 Zellen mit 1-D-MT oder 1-L-MT gegenüber der Vorbehandlung in Medium beobachtet (Abb. 12 b, c, d). In Gegenwart des COX2 Inhibitors Dup697 (iii) an Stelle der IDO Inhibitoren konnte eine weitere Steigerung der Effektivität der γδ T-Zellen in 3 von 4 Fällen beobachtet werden (Abb. 12 b, c). Eine Kombination aus Dup697 und IDO Inhibitor konnte die Lyse der Tumorzellen nicht zusätzlich steigern (Abb. 12 d).



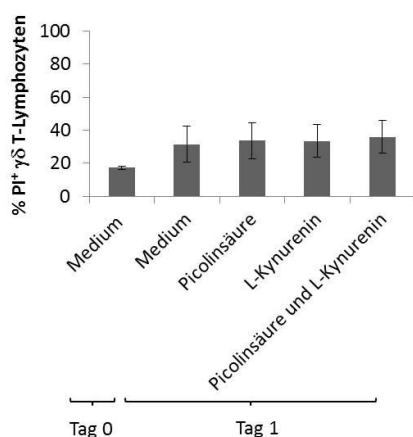
**Abbildung 12: Lyse von Colo357 Zellen unter Einfluss eines COX2 und zweier IDO Inhibitoren.** 5000 -7500 Tumorzellen pro Kavität wurden zusammen mit 1 mM 1-D/L-MT, 50  $\mu$ M Dup697 (Tocris) oder mit Kombinationen der Inhibitoren und Dup697 ausgesetzt. Nach initialer Wachstumsphase wurde die Veränderung des Zellindex in Gegenwart von  $\gamma\delta$  T-Zellen unterschiedlicher Spender, die im E/T Verhältnis von 25:1 mit 12,5 U/ml IL-2 hinzu gegeben worden sind, beobachtet. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden entweder mit 1  $\mu$ g/ml [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] (hellblau, a, e, f) oder 300 nM BrHPP (rot, a-d) alleine oder in Anwesenheit der Inhibitoren (wie in der Legende angegeben) restimuliert. Eine Wachstums- [hellgrün, (0)] und Positivkontrolle für die Triton-X-100 vermittelte Lysekapazität [schwarz, (i)] wurde mitgeführt. Dargestellt ist der kurz vor Zugabe der  $\gamma\delta$  T-Zellen normalisierte Zellindex, der im angegebenen Zeitintervall alle 3 Minuten gemessen wurde. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus Triplikaten mit Standardabweichung. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Anzahl vergleichbarer Experimente (x) bei n Versuchsdurchführungen (x/n).

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass bei diesen Experimenten eine größere Steigerung der Lysefähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Restimulation mit dem *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] an Stelle von BrHPP auftrat sowie durch Inkubation der Tumorzellen mit den IDO Inhibitoren 1-D/L-MT unabhängig ihres Stereoisomers. Kombinationen der IDO Inhibitoren zeigten keinen additiven Effekt (Daten nicht gezeigt).

Eine Inkubation von Colo357 Zielzellen mit einem COX2 Inhibitor übertraf die durchIDO Inhibitoren bedingte Steigerung der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse. Eine Kombination des COX2 Inhibitors mit IDO Inhibitoren führte zu keiner weiteren Steigerung der zytotoxischen Kapazität verglichen mit der des COX2 Inhibitors alleine.

## 4.4 Behandlung mit IDO Zwischenprodukten

Eine gesteigerte enzymatische Aktivität des IDO1 Enzyms mit der Folge niedriger Tryptophan Spiegel sowie die Akkumulation von Metaboliten des Tryptophan Katabolismus (z.B. in der Tumormikroumgebung) können Mechanismen einer Tumor-induzierten Immunsuppression sein (Witkiewicz et al. 2008). Kynurenin als Produkt des ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritts des Tryptophan Katabolismus genauso wie das



**Abbildung 13:** Zelltod von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten unter Einfluss von IDO Stoffwechselprodukten. Dargestellt ist der Einfluss von 1 mM L-Kynurenin (Tocris) und 1 mM Picolinsäure (Sigma) sowie einer Kombination beider Substanzen im Vergleich zu Werten im Medium an Tag 0 und Tag 1. Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wurden für 24 Std. mit den IDO Stoffwechselprodukten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PI (Serva, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) markiert und die Interkalation durchflusszytometrisch am FACS Calibur unter Anwendung der CellQuestPro Software bestimmt. Die Balkendiagramme stellen Mittelwerte von 6 Spendern mit entsprechender Standardabweichung dar.

nachgeschaltete Produkt Picolinsäure sind beschrieben worden eine immunsuppressive Tumormikroumgebung und somit Tumorzellwachstum zu begünstigen (Platten et al. 2014). Ziel der folgenden Untersuchungen war es, Aufschluss über den Einfluss dieser Metabolite auf die Interaktion zwischen  $\gamma\delta$  T-Zellen und PDAC Zellen zu bekommen.

### 4.4.1 Einfluss von IDO Zwischenprodukten auf den Zelltod

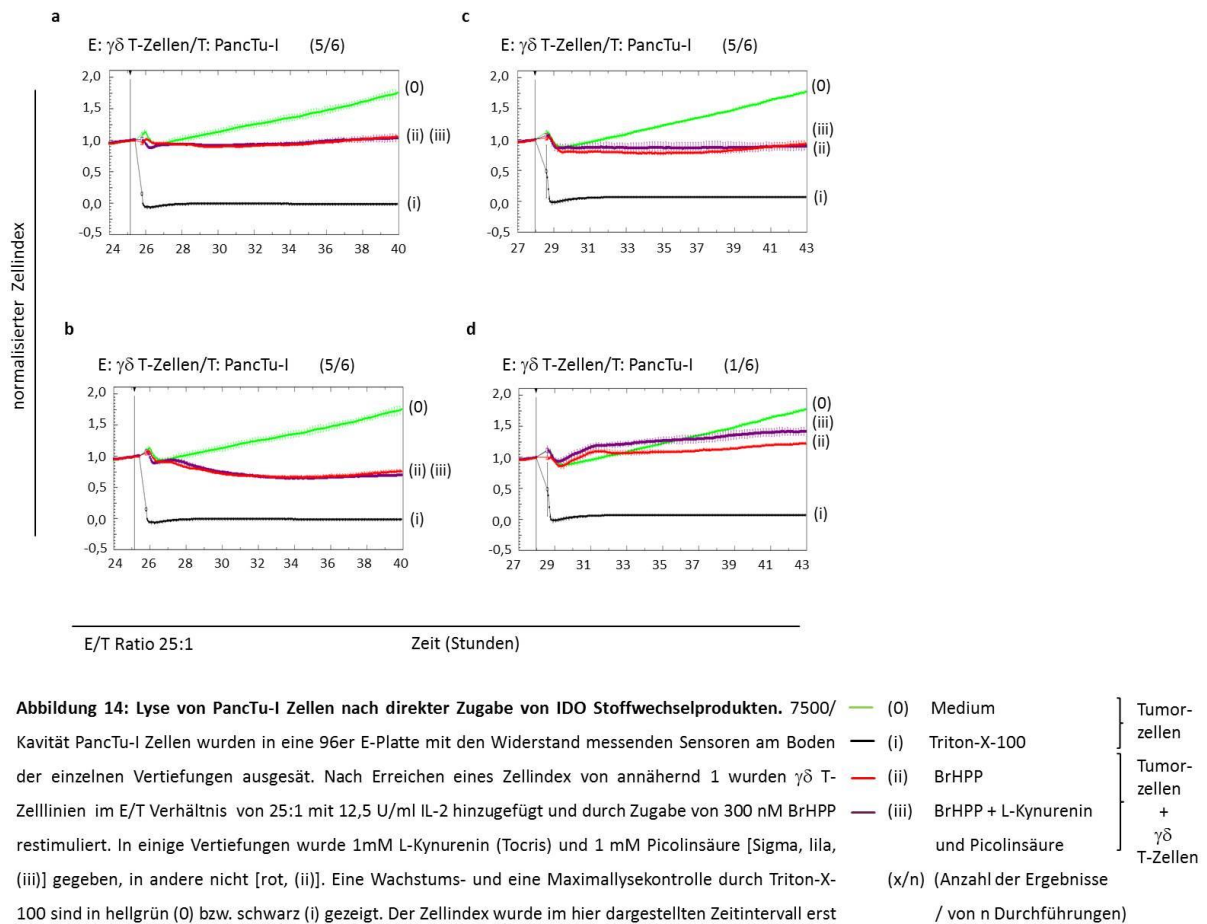
Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen der PI Interkalation wurde der Einfluss von 1 mM L-Kynurenin, 1 mM Picolinsäure und einer Kombination beider Substanzen auf den Zelltod der  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht (Abb. 13). Verglichen wurde der Prozentsatz PI positiver  $\gamma\delta$  T-Zellen an Tag 0 und 1 mit dem nach 24 stündiger

Inkubation der IDO Stoffwechselprodukte mit  $\gamma\delta$  T-Zellen. Der Mittelwert PI positiver Zellen im Medium an Tag 1 (31,4 % PI<sup>+</sup>) unterschied sich von den Mittelwerten der Inkubation mit entweder L-Kynurenin (33,6 % PI<sup>+</sup>) oder Picolinsäure (33,8 % PI<sup>+</sup>) um etwa 2 %, bei Inkubation mit beiden Stoffwechselprodukten um etwa 4 %. Somit konnte keine Induktion von Zelltod durch L-Kynurenin oder Picolinsäure in  $\gamma\delta$  T-Zellen festgestellt werden.

#### **4.4.2 Beeinflussung der $\gamma\delta$ T-Zell vermittelten Lyse einzelner PDAC Zellen durch Metabolite des Tryptophan Katabolismus**

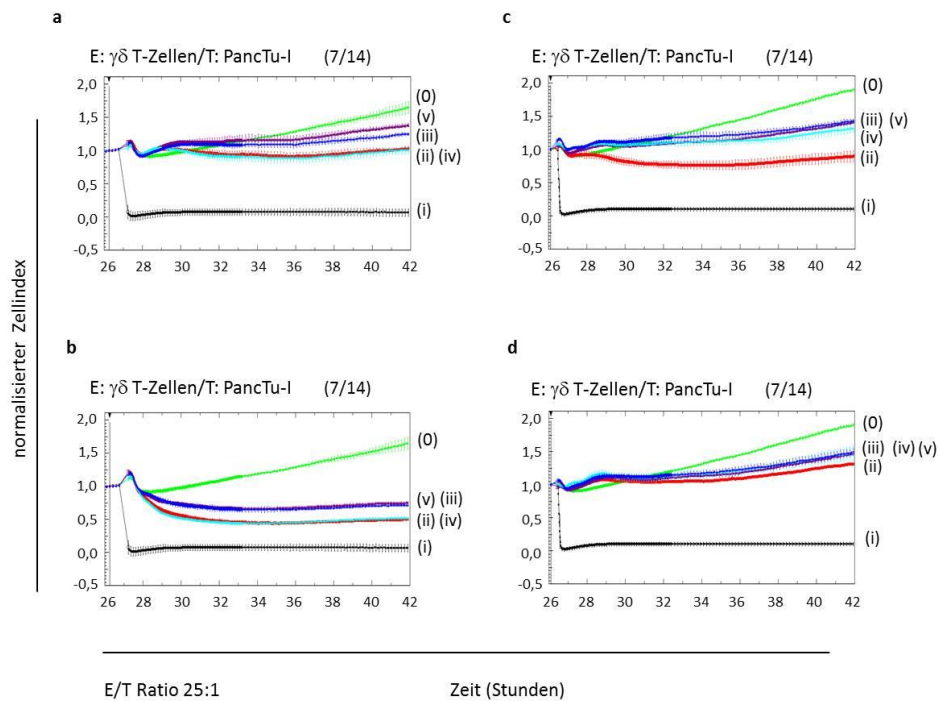
Eine mögliche erhöhte Konzentration von Kynurenin und Picolinsäure in der Tumormikroumgebung, könnte die  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse primärer PDAC Zellen wie der PancTu-I als auch der Zellen metastasierenden Ursprungs wie Panc89 Zellen beeinflussen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden 7500 PancTu-I Zellen pro Kavität in 96er E-Platten ausgesät. Nach Erreichen eines Zellindex von 1 wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien verschiedener Spender im E/T Verhältnis von 25:1 mit 12,5 U/ml IL-2 hinzugefügt und durch Zugabe von 300 nM BrHPP restimuliert. Zudem erfolgte die direkte Zugabe von 1 mM L-Kynurenin und 1 mM Picolinsäure [Abb. 14 (iii)] oder nicht [Abb. 14 (ii)]. Im Vergleich zur Mediumkontrolle [Abb. 14 (0)] wurde eine Reduktion der Tumorzellimpedanz (= Tumorzelllyse) durch die Zugabe von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien innerhalb der folgenden 24 Stunden beobachtet. Die Zugabe der Kombination aus beiden Stoffwechselprodukten [Abb. 14 (iii)] hatte in 5 von 6 Fällen keinen Einfluss auf die PAg-aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse der PancTu-I Zellen [Abb. 14 (ii)]. Ausgenommen ist hiervon der Versuch mit  $\gamma\delta$  T-Zell Lymphozyten eines Spenders, in dem sich eine zaghafte Verminderung der Lyse unter Einfluss der Stoffwechselprodukte zeigte, welche jedoch nicht signifikant war (Abb. 14 d).

Wachstumskontrollen, in denen die PDAC Zelllinien PancTu-I und Panc89 mit einer Kombination aus L-Kynurenin und Picolinsäure inkubiert wurden, zeigten im RTCA keine durch die Stoffwechselprodukte bedingte Abnahme des Wachstums der Tumorzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (Daten nicht gezeigt).



Um auszutesten, ob die Metabolite des Tryptophan Katabolismus eine längere Einwirkzeit benötigen um Effekte zu zeigen, wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen vorinkubiert und anschließend mit Tumorzellen kokultiviert. Eine Vorinkubation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozytenlinien in Medium, versetzt mit 1 mM L-Kynurenin, 1 mM Picolinsäure oder einer Kombination beider Stoffe in 6er Kavitäten Platten mit 12,5 U/ml IL-2 für ca. 24 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> beeinflusste die Lyse der PancTu-I Zellen wie folgt (Abb. 15): In 7 von 14 Durchführungen, von denen vier exemplarisch dargestellt sind (a-d), wurde die Lyse bei Zugabe von 1 mM L-Kynurenin allein (iii) oder einer Kombination aus beiden Stoffwechselprodukten (v) gleichermaßen abgeschwächt im Unterschied zu der Vorinkubation mit Picolinsäure allein (iv), welche keinen Effekt zeigte. Der normalisierte Zellindex nahm gegenüber den in Medium

kultivierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten (ii) bei vorangehender Inkubation mit Picolinsäure allein (iv) lediglich in einem von sechs Experimenten zu (Daten nicht gezeigt).

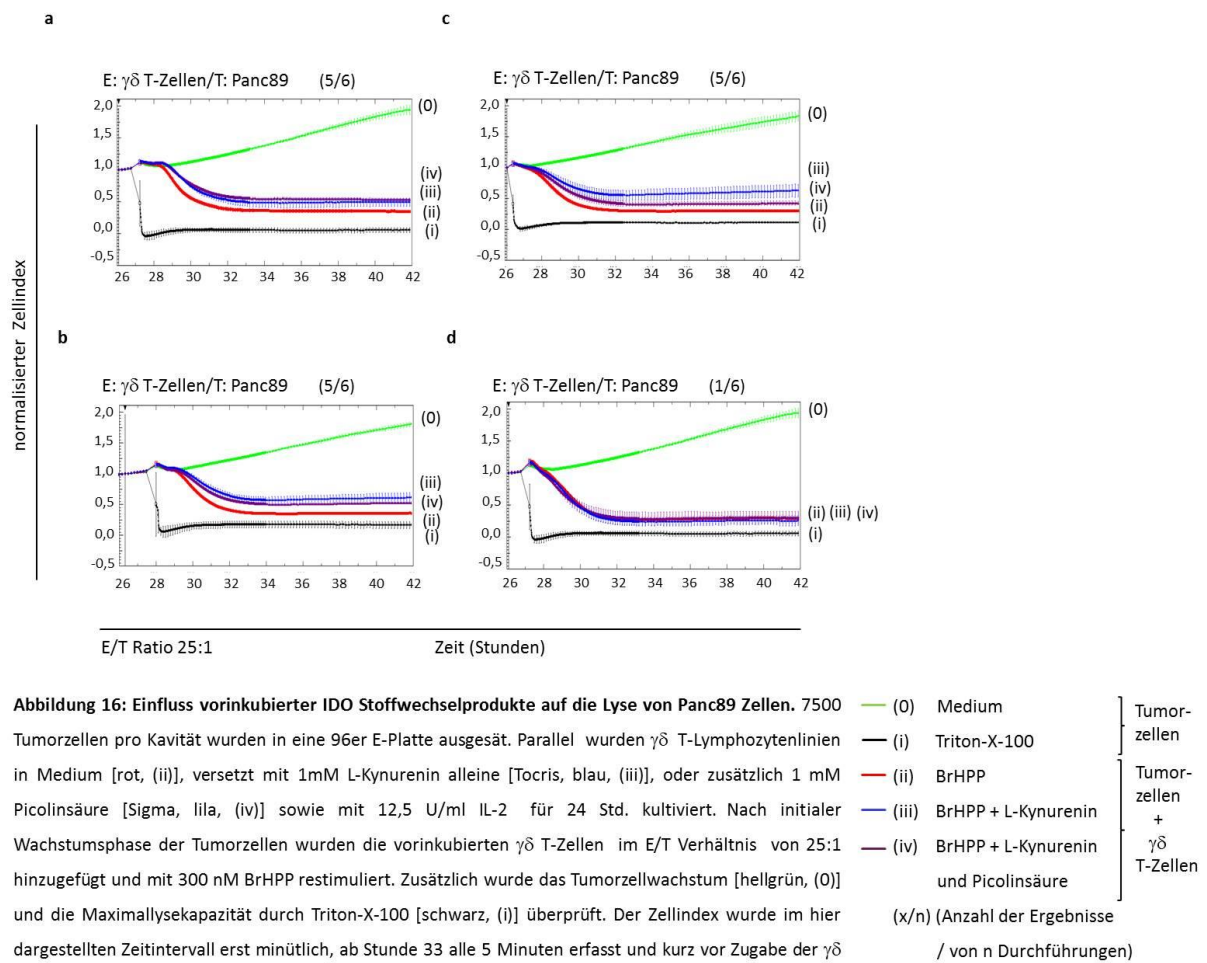


**Abbildung 15: Einfluss vorinkubierter IDO Stoffwechselprodukte auf die Lyse von PancTu-1 Zellen.** 7500 Tumorzellen pro Kavität wurden in eine 96er E-Platte ausgesät. Parallel wurden  $\gamma\delta$  T-Lymphozytenlinien mit 1 mM L-Kynurenin [Tocris, blau, (iii)], 1 mM Picolinsäure [Sigma, hellblau, (iv)], einer Kombination beider Stoffe [lila, (v)] oder in Medium [rot, (ii)] sowie mit 12,5 U/ml IL-2 in 6 Kavitäten Platten für ca. 24 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Erreichen eines Zellindex von annähernd 1 wurden die vorinkubierten  $\gamma\delta$  T-Zellen im E/T Verhältnis von 25:1 hinzugefügt und mit 300 nM BrHPP restimuliert. Eine Wachstums- und eine Positivkontrolle für die durch Triton-X-100 vermittelte maximale Lysekapazität sind in hellgrün (0) bzw. schwarz (i) gezeigt. Der Zellindex wurde im hier dargestellten Zeitintervall erst minütlich, ab Stunde 33 alle 5 Minuten erfasst und kurz vor Zugabe der  $\gamma\delta$  T-Zellen normalisiert. Exemplarische Abbildung von 4 der 14 Versuche. Dargestellt ist ein Beispiel der Anzahl vergleichbarer Experimente (x) bei n Versuchsdurchführungen (x/n). Für die Darstellung wurde der Mittelwert aus Triplikaten mit entsprechender Standardabweichung gebildet.

<ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: green;">—</span> (0) Medium</li> <li><span style="color: black;">—</span> (i) Triton-X-100</li> <li><span style="color: red;">—</span> (ii) BrHPP</li> <li><span style="color: blue;">—</span> (iii) BrHPP + L-Kynurenin</li> <li><span style="color: cyan;">—</span> (iv) BrHPP + Picolinsäure</li> <li><span style="color: purple;">—</span> (v) BrHPP + L-Kynurenin und Picolinsäure</li> </ul>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 5px;">}</div> <div style="text-align: left;">Tumor- zellen</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 5px;"> <div style="margin-right: 5px;">}</div> <div style="text-align: left;">Tumor- zellen + <math>\gamma\delta</math> T-Zellen</div> </div>
(x/n) (Anzahl der Ergebnisse / von n Durchführungen)	

Die PDAC Zelllinie Panc89 wurde in fünf von sechs durchgeführten Experimenten, von denen vier exemplarisch dargestellt sind (Abb. 16), von vorinkubierten  $\gamma\delta$  T-Zellen (iii, iv) weniger stark lysiert als von in Medium kultivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen (ii) (Abb. 16 a, b und c). Sowohl L-Kynurenin (iii) als auch die Kombination mit Picolinsäure (iv) führten zu einem Anstieg des normalisierten Zellindex und damit zu einer verminderten Lyse von Panc89 Zellen. In drei der

fünf Fälle bewirkte die Zugabe des L-Kynurenin alleine die stärkere Abschwächung der Lyse gegenüber der Addition beider Stoffwechselprodukte (Daten nicht gezeigt).



## **4.5 Einfluss von IDO Stoffwechselprodukten auf die Degranulation von $\gamma\delta$ T-Zellen**

Nach der selektiven Erkennung ihrer phosphorylierten Antigene setzen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten Granzyme und Perforine, welche in lytischen Granula gespeichert werden, frei. Hierbei wird das lysosomal assoziierte Membranglykoprotein CD107a (LAMP-1) während der Degranulation transient an der Oberfläche der T-Zellen exprimiert. Mit einer durchflusszytometrischen Analyse dieses Markerproteins sollte die Stärke der Degranulation untersucht werden. Im Hinblick auf die zytotoxische Kapazität der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten interessierte in vorgelegter Doktorarbeit vor allem, mögliche Veränderungen der Degranulation unter Einfluss von IDO Mediatoren zu erfassen.

### **4.5.1 Effekte von IDO Inhibitoren auf die Degranulation von $\gamma\delta$ T-Zellen**

Diese folgenden Versuche dienten der Überprüfung der Hypothese, ob eine Inhibition des Tryptophan Abbaus und der Verminderung somit anfallender Stoffwechselprodukte die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und deren Degranulation verstärken würde. 5 bis  $7,5 \times 10^3$  Zellen verschiedener PDAC Zelllinien wurden in Zellkulturmedium in 96er U-Mikrotiterplatten ausgesät und entweder nur in Medium oder mit 1 mM 1-D-MT, 1-L-MT oder NaOH inkubiert. Nach 20 Stunden wurden mit BrHPP (PAg) restimulierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in einem Effektor:Zielzell Verhältnis von 25:1 zu den PDAC Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurden auch Proben mit nicht restimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten (nicht gezeigt) sowie Proben ohne Zusatz von PDAC Zellen durchgeführt. Die CD107a Expression wurde nach 4 stündiger (Ko)kultivierung durchflusszytometrisch gemessen. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche graphisch dargestellt.

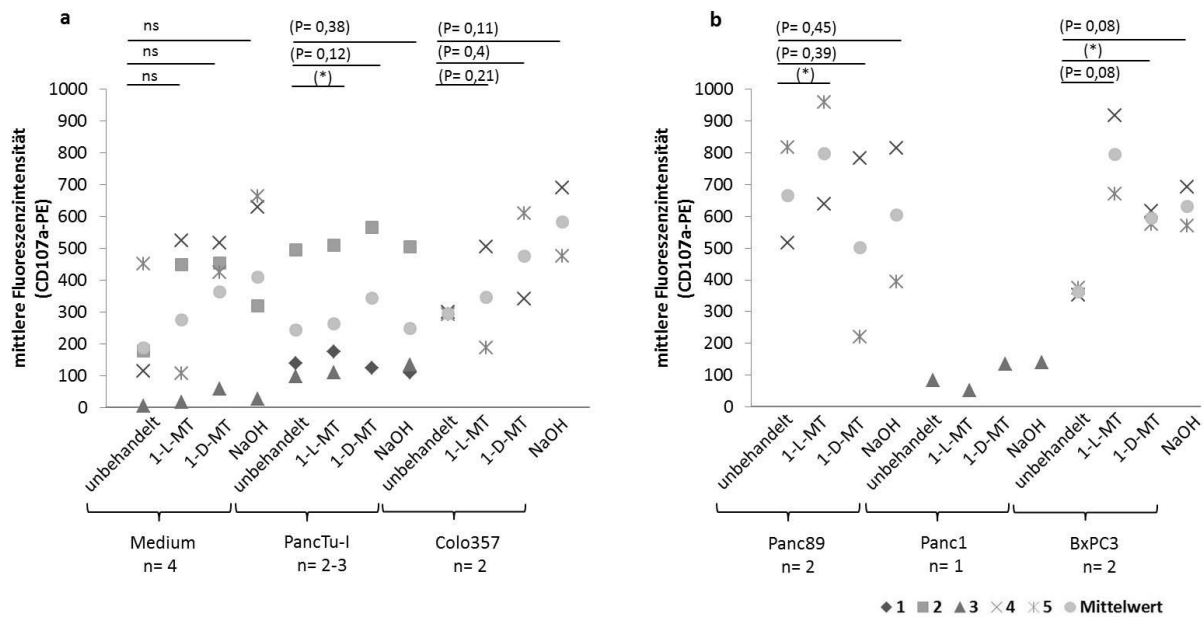
Wurde die Degranulation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ohne Beisein einer Tumorzelllinie nach PAg-Stimulation untersucht, war eine Erhöhung der CD107a Werte sowohl mit IDO Inhibitoren als auch mit der Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zur Mediumkontrolle zu erkennen. Dies



spiegelte sich in einem Mittelwert (MFI= mittlere Fluoreszenzintensität) von 186,2 ohne Zugabe der Inhibitoren und von 273,7 MFI für 1-L-MT und 362,7 MFI für 1-D-MT sowie 408,6 MFI für die Lösungsmittelkontrolle wieder (Abb. 17 a). Wurden neben der PAg-Stimulation PancTu-I Zellen als Zielzellen verwendet, zeigte sich eine Zunahme der CD107a Expression unter Verwendung von 1-L-MT und bis auf eine Ausnahme auch bei 1-D-MT verglichen mit der CD107a Expression PAg-restimulierter  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ohne Vorinkubation eines IDO Inhibitors. Die Mittelwerte stiegen von 242,5 MFI ohne Vorinkubation eines Inhibitors auf 263,5 MFI für 1-L-MT und 343,4 MFI für 1-D-MT. Die Lösungsmittelkontrolle fiel mit einem Mittelwert von 122,1 MFI gering aus (Abb. 17 a). Der Mittelwert der CD107a Expression der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit Zielzellen der PDAC Linie Colo357 war bei Inkubation von 1-D-MT mit 474,5 MFI, 1-L-MT mit 345,2 MFI und NaOH mit 582,7 MFI ebenfalls höher als der Mediumwert mit 294,8 MFI. Bei Verwendung der Tumorzelllinie Panc 1, welche kaum IDO exprimierten (siehe auch Abb. 2) konnte eine leicht verstärkte CD107a Expression unter Verwendung von 1-D-MT festgestellt werden, wie auch bei Inkubation der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 17 b). Insgesamt waren die Effekte der IDO Inhibitoren nach Zugabe der Panc1 Zellen eher schwach im Vergleich zu den anderen Tumorzellen.

Wurden die Tumorzelllinien Panc89 oder BxPC3 verwendet, zeigte sich eine insgesamt stärkere Degranulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu den anderen Tumorzellen. Der Mittelwert der CD107a Expression war nach Inkubation mit 1-L-MT gegenüber dem Mediumwert und der Lösungsmittelkontrolle erhöht. Bei Experimenten mit BxPC3 wurde zudem die Degranulation durch 1-D-MT und NaOH gegenüber dem Mediumwert leicht verstärkt (Abbildung 17 b).

Bei den Tumorzelllinien PancTu-I, Panc1, Colo357 sowie der Inkubation in Medium erhöhte die Inkubation von 1-D-MT stärker als 1-L-MT die Degranulation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten. Anzumerken sind die hohen Werte der CD107a Expression in den Lösungsmittelkontrollen (ausgenommen PancTu-I). Ein Effekt der Lösungsmittelkontrolle war nicht bei Panc89- und BxPC3 Zellen zu verzeichnen. Vor allem die Inkubation von 1-L-MT führte bei den gegenüber der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse suszeptiblen Linien Panc89 und BxPC3 (in Anwesenheit von PAg) zu einer verstärkten Degranulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen.



**Abbildung 17: CD107a Expression unter Einfluss von IDO Inhibitoren.** Je 5000-7500 Tumorzellen der dargestellten Linien (a, b) wurden entweder in Medium alleine, mit 1 mM 1-L-MT (Sigma), 1 mM 1-D-MT (Sigma) oder 1 mM der Lösungsmittelkontrolle NaOH kultiviert. Nach 20 Std. wurden  $\gamma\delta$  T-Lymphozytenlinien mit 15 U/ml IL-2 und 300 nM BrHPP im E/T Verhältnis 25:1 hinzugefügt. Die CD107a Expression (Klon H4A3, BD, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wurde nach 4 stündiger (Ko)kultivierung am FACS Calibur mit der CellQuestPro Software gemessen. Angegeben sind die einzelnen Versuche (1-5), hieraus gebildete Mittelwerte und die Anzahl der gesamten Versuchsdurchführungen (n) pro Tumorzelllinie bzw. Versuch in Medium. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Student's t-Test (ausgenommen Tuz Panc1 bei n= 1). Die Signifikanzen sind dargestellt als P Wert; \*= P  $\leq$  0,05 und ns= nicht signifikant. Die Tendenz einer Zunahme der Degranulation durch die Inhibitoren wurde in zweifach durchgeführten Versuchen mit den Tumorzelllinien Colo357, Panc89 und BxPc3 beobachtet. Da es sich lediglich um zwei Experimente handelt, wurde die Signifikanzberechnung bei diesen Versuchen in Klammern gesetzt.

## 4.5.2 Effekte von IDO Zwischenprodukten auf die Degranulation von $\gamma\delta$ T-Zellen

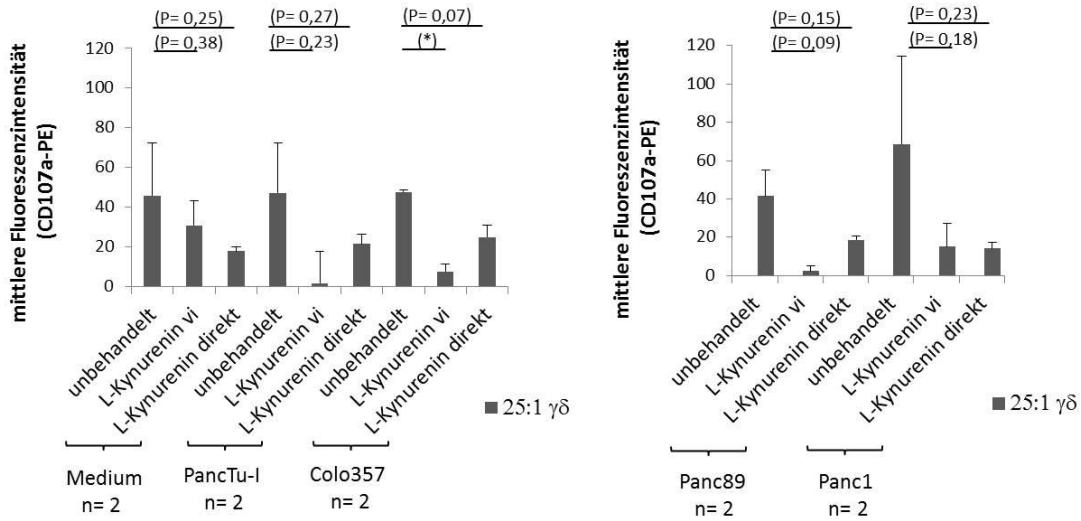
Im Folgenden wurde zusätzlich analysiert welchen Einfluss Kynurenin auf die CD107a Expression der  $\gamma\delta$  T-Zellen hat. Hierfür wurden 5 bzw.  $7,5 \times 10^3$  Zellen verschiedener PDAC Zelllinien in Zellkulturmedium in 96er U-Mikrotiterplatten ausgesät. Parallel wurden  $25 \times 10^4$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in Zellkulturmedium in eine separate Platte gegeben. Sie wurden für 20 Stunden mit 15 U/ml IL-2 in Medium oder mit einer Endkonzentration von 1 mM L-Kynurenin inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit BrHPP (PAG) restimuliert und in einem Effektor:Zielzell Verhältnis von 25:1 zu den PDAC Zellen gegeben. In einigen Versuchen erfolgte auch die direkte Zugabe von L-Kynurenin zusammen mit den Lymphozyten zu den PDAC Zellen. Zur Kontrolle wurden auch Proben mit nicht

restimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten verwendet. Die CD107a Expression wurde nach 4 stündiger (Ko)kultivierung durchflusszytometrisch gemessen.

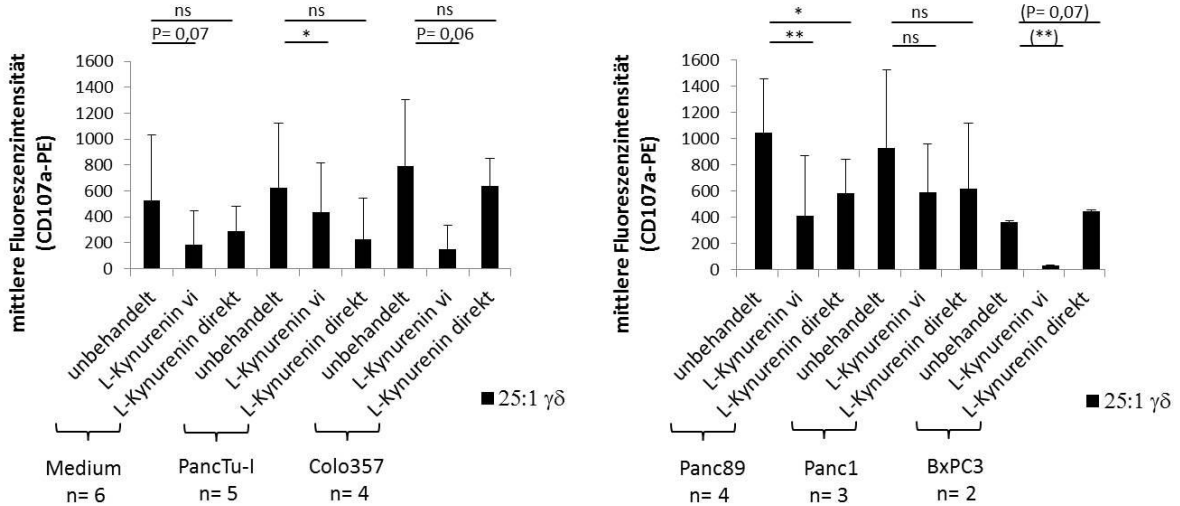
Die Ergebnisse des Einflusses einer Präinkubation oder der direkten Zugabe von L-Kynurenin sind in der Abbildung 18 dargestellt. Nicht restimulierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten (Abb. 18 a) wiesen eine verminderte mittlere CD107a Expression sowohl nach Vorinkubation als auch direkter Zugabe des IDO Stoffwechselproduktes verglichen mit den Werten ohne Zusatz von L-Kynurenin auf. Dies trat unabhängig davon auf, ob PDAC Zellen der Linie PancTu-I, Colo357, Panc89 oder Panc1 als Zielzellen verwendet oder eine Inkubation in Medium ohne Tumorzellen durchgeführt wurde. Zu beobachten war jedoch, dass die Effekte in Anwesenheit von Tumorzellen weitaus ausgeprägter waren. Eine Vorinkubation führte bei Einsatz von PancTu-I, Colo357 und Panc89 Zellen zu einer stärkeren Abschwächung der Degranulation gegenüber der direkten Zugabe von L-Kynurenin, wohingegen eine Degranulation in Gegenwart der PDAC Zelllinie Panc1 oder in Medium bei der direkten Zugabe von L-Kynurenin am stärksten reduziert wurde (Abb. 18 a). Wie in Abbildung 18 b dargestellt ist, nahm die mittlere CD107a Expression bei Präinkubation PAg-restimulierter  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit L-Kynurenin ebenfalls unabhängig davon ab, ob Zielzellen der PDAC Zelllinien PancTu-I, Colo357, Panc89, Panc1 oder BxPC3 verwendet oder eine Inkubation in Medium allein durchgeführt wurde. Die direkte Zugabe des IDO Stoffwechselprodukts führte ebenso in nahezu allen verwendeten PDAC Zelllinien abgesehen von BxPC3 zu einer Reduktion der CD107a Expression. Bei Verwendung der Zelllinie PancTu-I führte die direkte Zugabe von L-Kynurenin zu einer stärkeren Abnahme als die Vorinkubation.

Es lässt sich zusammenfassen, dass der Zusatz von 1 mM L-Kynurenin zu restimulierten und nicht restimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zu einer tendenziellen Reduktion der CD107a Expression in Gegenwart aller verwendeter PDAC Zelllinien führte. Die direkte Zugabe von L-Kynurenin führte außer bei (Ko)kultur der Zelllinie BxPC3 mit restimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in allen anderen untersuchten Konstellationen ebenfalls zu einer Abnahme der Degranulation.

### a Medium



### b BrHPP



## 5. Diskussion

### 5.1 Einfluss der IDO Expression auf die Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Lysefähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen variiert abhängig davon, welche PDAC Zelllinien als Zielzellen fungieren. Bis auf Capan-1 Zellen sind alle PDAC Zellen resistent gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse solange man sie nicht mit PAg restimuliert. Nach einer Restimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit PAg und einer (Ko)kultivierung mit PDAC Zellen ergibt sich folgendes Bild: Während Panc89 Zellen suszeptibel für die  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse sind, gelten PancTu-1 Zellen als nahezu und Colo357 Zellen als vollständig resistent (Abschnitt 4.1 u. Abb. 1). Diese Heterogenität der Tumore ist ein Hindernis für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms. Ein Ziel ist daher, individuelle diagnostische und prognostische Marker innerhalb der PDAC zu identifizieren, um so eine personalisierte Medizin zu ermöglichen. IDO könnte solch ein diagnostischer Marker der Krebstherapie werden, zumal der Tryptophan Stoffwechselweg als Regulator der angeborenen und adaptiven Immunität gilt und die Fähigkeit besitzt, T-Zell Antworten zu unterdrücken (Platten et al. 2014). Die Expression und/oder Aktivität von IDO wurde sowohl in primär karzinogenen als auch in metastatischen Geweben beobachtet und ist in der Mehrheit der Studien mit einem schlechten klinischen Ergebnis assoziiert, beispielsweise einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer niedrigen Überlebensrate (Brochez et al. 2017). Dies gilt unter anderem für das Mammakarzinom, Melanom, Kolorektale Karzinom, Hepatozelluläre Karzinom und wurde auch für das Pankreaskarzinom beschrieben (Chen et al. 2014; Melief et al. 2017; Brody et al. 2009; Brandacher et al. 2006; Asghar et al. 2017; Zhang et al. 2017). In den in dieser Arbeit sowohl durchflusszytometrisch als auch mit Hilfe des Western Blot durchgeführten Versuchen wurden die PDAC Zelllinien metastasierenden Ursprungs Colo357 und Capan-1 als am stärksten IDO1 und 2 exprimierende Zelllinien detektiert (Abschnitt 4.2.1). Zudem wies die PDAC Zelllinie BxPC3, die einem primären Tumor entstammt, durchflusszytometrisch eine hohe IDO Expression auf. Diese konnte im Western Blot nicht bestätigt werden. Da in früheren Untersuchungen die IDO Expression in Mammakarzinomen

als hoch beschrieben worden ist und in Korrelation zu fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung steht, wurde zudem die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 vergleichend als Positivkontrolle in beiden Methoden verwendet (Isla Larrain et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde also gezeigt, dass Zellen der Linie Colo357, die kaum von  $\gamma\delta$  T-Zellen lysiert werden, sowohl im Western Blot als auch durchflusszytometrisch ein hohes Maß anIDO exprimieren. Zellen der Linien Panc89 und PancTu-1, die im Vergleich weniger IDO exprimieren, werden hingegen effektiv lysiert (Abschnitt 4.4.2). Wurde Kynurenin zu PDAC Zelllinien hinzugefügt, verminderte sich die durch  $\gamma\delta$  T-Zellen vermittelte Lyse. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Lysefähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen invers mit der IDO Expression in PDAC Zellen korreliert und daher IDO ein Resistenzmechanismus gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse der PDAC Zellen darstellt.

Das Prinzip der IDO vermittelten Immunsuppression basiert zum einen auf der Enzym bedingten Erniedrigung des Tryptophan Spiegels mit konsekutiver Aktivierung der GCN-2 Kinase und zum anderen auf der Ansammlung von Metaboliten des Tryptophan Katabolismus mit Aktivierung des Aryl Hydrocarbon Rezeptors (Platten et al. 2014). Anzumerken ist jedoch, dass zwar das Prinzip der IDO vermittelten Immunsuppression verstanden scheint, die einzelnen Mechanismen jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt sind. So scheinen auch transzelluläre Transport Systeme eine Rolle im Katabolismus zu spielen. Ihre Aufgabe besteht darin, den Tryptophan Metabolismus der extra- und intrazellulären Kompartimente zu verbinden (Platten et al. 2014; Kaper et al. 2007). Zudem führen onkogene Signalwege über den Verlust des Tumorsuppressorgens BIN1 mit Aktivierung von STAT1 und NF $\kappa$ B zu vermehrter Protein Expression und über Aktivierung von STAT3 und IL-6 zur Expression von mRNA und Protein sowie zu einer Ansammlung von Kynurenin, mit nachfolgender Hemmung von T-Lymphozyten (Muller et al. 2005; Litzenburger et al. 2014; Campia et al. 2015). Aus diesen alternativen Transportrouten und Signalwegen ergeben sich zusätzlich vielfältige Möglichkeiten therapeutisch in den Tryptophan Stoffwechselweg einzugreifen. So könnte beispielsweise ein Ziel sein, die transzellulären Transporter derart zu beeinflussen, dass auch bei niedrigen Tryptophan Spiegeln in Immunzellen ausreichend hohe Mengen dieser Aminosäure vorhanden sind (Platten et al. 2014). Da unter bestimmten Bedingungen ein immunsuppressiver Phänotyp in

$\gamma\delta$  T-Zellen induziert wird und unter Einfluss des Metabolits Kynurenin eine Differenzierung naiver  $CD4^+$  T-Zellen zu Tregs beobachtet worden ist, sollte auch eine Beteiligung derIDO Metabolite an der Induktion eines immunsuppressiven Phänotyps in  $\gamma\delta$  T-Zellen erwogen werden (Wesch et al. 2014; Platten et al. 2014; Chitadze et al. 2017).

Zudem ist bekannt, dass das Enzym IDO durch proinflammatorische Zytokine wie  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  induziert und so seine immunsupprimierende Wirkung verstärkt werden kann (Taylor et al. 1991; Robinson et al. 2003; Munn et al. 1999). In Abschnitt 4.2.2 wird die Wirkung von  $IFN-\gamma$  auf die IDO Expression in den PDAC Zelllinien PancTu-1 und Panc89 beschrieben. Bei Stimulation mit 100 ng/ml bzw. 500 ng/ml  $IFN-\gamma$  wurde eine Induktion der IDO1 Expression im Western Blot nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wesch und PD Dr. Oberg zeigte, dass  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  von stimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten freigesetzt werden (Wesch et al. 2006; Pietschmann et al. 2009; Beetz et al. 2008). Hierbei bewirkt die Stimulation des TZR durch PAg eine Aktivierung MEK/Erk (*extracellular signal regulated kinase*) und PI-3K/Akt (*Phosphatidylinositol-3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*) vermittelter Signalwege, die die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine induziert (Correia et al. 2009). In (Ko)kultur mit  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten könnte eine Hochregulation von IDO in PDAC Zelllinien also auf solche Zytokine zurückzuführen sein. Dass eine vermehrte  $IFN-\gamma$  Produktion zu verminderter  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten Proliferation führen kann, wurde durch den Einsatz genetisch modifizierter mesenchymaler Stammzellen bereits nachgewiesen (Fechter et al. 2017). In der betreffenden Studie wurde ein negativer Feedback-Mechanismus von vermehrter Produktion zu verminderter Proliferation beschrieben, in dem von aktivierten  $V\delta 2^+$  T-Zellen produziertes  $IFN-\gamma$  die immunsupprimierende Kapazität in mesenchymalen Stammzellen erhöhte. Mesenchymale Stammzellen exprimierten daraufhin nicht nur vermehrt IDO und COX2, sondern setzen auch vermehrt lösliche Faktoren frei mit der Folge einer Inhibition der Proliferation und Zytokin Produktion von  $V\delta 2^+$  T-Zellen. Dass zu diesen löslichen Faktoren  $PGE_2$  gehört wurde bereits beschrieben, widersprüchliche Angaben finden sich dazu, ob Kynurenin, das Produkt von IDO, ebenfalls zu diesen Faktoren gezählt werden kann (Fechter et al. 2017; Martinet et al. 2009; Pietschmann et al. 2009; Munn et al. 2002).

Neben der Induktion einer tolerogenen Tumormikroumgebung über negatives Feedback trägt IFN- $\gamma$  auch dazu bei, Stammzellen ähnliche Tumorzellen (engl. *tumor repopulating cells*, TRC) in einen Zustand der Seneszenz (engl. *dormancy*) zu versetzen (Liu et al. 2017). Liu und Kollegen demonstrierten, dass IFN- $\gamma$  eine IDO1 vermittelte Signalkaskade induziert, die über die Ansammlung von Kynurenin und die Aktivierung des Aryl Hydrocarbon Rezeptors (AHR) zur Induktion der *dormancy* führt. Anzumerken ist, dass diese Wirkung von IFN- $\gamma$  ausschließlich in TRC und nicht in differenzierten Tumorzellen, die einen geringeren IDO1 und AHR Gehalt sowie eine geringere Anzahl einwärts gerichteter transzellulärer Tryptophan Transporter als TRC besitzen, beobachtet werden konnte (Liu et al. 2017). Eine Blockade der *dormancy* durch die Applikation des IDO Inhibitors 1-MT oder des AHR Inhibitors 3',4'-*dimethoxyflavone* (3',4'-DMF) könnte in der Lage sein das Stadium der Seneszenz aufzuheben und möglicherweise in Kombination mit der Applikation von IFN- $\gamma$  eine Interferon induzierte Apoptose in den TRC auszulösen. In ersten Versuchen mit IFN- $\gamma$  und den Inhibitoren beobachteten Liu und Kollegen die Translokation von STAT1 in den Nucleus und die Aktivierung der an Apoptose beteiligten Caspasen 3 und 7. Auch wenn noch Unkenntnis über Spezifität und Toxizität von AHR Inhibitoren und Unklarheit über die einzusetzende Höhe der Konzentration von IFN- $\gamma$  besteht, zeigt die Wirksamkeit der Kombination aus IFN- $\gamma$  und IDO oder AHR Inhibitor doch das Potential dieser Stoffe, auf vielfältige Weise in verschiedene IDO vermittelte *cancer escape* Mechanismen einzugreifen (Platten et al. 2014; Liu et al. 2017). In Anbetracht neu entdeckter Funktionen des Moleküls IDO unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität, wie der TGF- $\beta$  vermittelten Induktion eines tolerogenen Phänotyps in dendritischen Zellen, scheint die Bedeutung von IDO Inhibitoren zuzunehmen (Pallotta et al. 2011).

Ein weiterer Resistenzmechanismus gegenüber der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse in PDAC ist die Expression der COX2 (Platten et al. 2014). Ähnlich wie das Enzym IDO ist die COX2 in geringen Konzentrationen in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Sie ist aber auch induzierbar und häufig in Tumoren hochreguliert (Abschnitt 1.4) (Platten et al. 2014). Die Induktion von COX2 in PDAC Zellen korrespondiert dabei mit der Resistenz gegenüber Effektorfunktionen von  $\gamma\delta$  T-Zellen und hat eine erhöhte Freisetzung des Metabolit



Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) zur Folge, wie die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wesch und PD Dr. Oberg demonstrieren konnte (Gonnermann et al. 2015). Hierbei fiel die Induktion des Enzyms in Colo357 Zellen durch das Zytokin TNF- $\alpha$  und nicht IFN- $\gamma$  auf. Im Gegensatz dazu wurde von Wong und Kollegen eine synergistische Wirkung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die COX2 Expression in Ovarialkarzinomzellen beschrieben (Wong et al. 2016). Dabei resultierte die Induktion von COX2 unter anderem in der Induktion vonIDO in myeloiden Suppressorzellen. In Anbetracht dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, welche Wirkung TNF- $\alpha$  neben IFN- $\gamma$  in einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse auf IDO hat und inwieweit die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und die Expression von IDO separate oder synergistisch wirkende immunsupprimierende Mechanismen sind. Chen und Kollegen gelang es, ein Zusammenspiel beider Enzyme zwischen gesundem proliferativen Gewebe und Karzinomzellen nachzuweisen. In (Ko)kulturrexperimenten mit Mammakarzinomzellen und Fibroblasten führte die PGE<sub>2</sub> Freisetzung der Karzinomzellen über den Prostaglandin E<sub>2</sub> Rezeptor 4 und STAT3 zu einer Hochregulation von IDO in Fibroblasten (Chen et al. 2014). Das von den Fibroblasten freigesetzte Kynurenin förderte über einen Komplex aus E-Cadherin/AHR/S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2 (Skp2) daraufhin den Abbau von E-Cadherin und die Invasivität der Karzinomzellen (Chen et al. 2014).

## **5.2 Überwindung der IDO vermittelten Resistenzmechanismen einer Lyse durch $\gamma\delta$ T-Zellen**

Wie in Abschnitt 4.4.2 und 4.5.1 beschrieben konnte nachgewiesen werden, dass Kynurenin die zytotoxische Kapazität der  $\gamma\delta$  T-Zellen reduziert. Auch nachgeschalteten Abbauprodukten des Kynureninstoffwechsels werden immunsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben (Platten et al. 2014). Vergleichend zu Kynurenin erfolgten Zytotoxizitätstests mit dem Metabolit Picolinsäure, allerdings ohne eine Abschwächung des zytotoxischen Potentials von  $\gamma\delta$  T-Zellen hervorzurufen. In der Literatur ist ein im Vergleich zu Kynurenin etwas schwächerer, Dosis abhängiger Effekt von Picolinsäure auf die Zellproliferation von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen beschrieben (Frumento et al. 2002). Daraus folgernd führte die wahrscheinlich schwächere Potenz des nachgeschalteten Metabolits

nicht zur Aktivierung des AHR, auch wenn eine Vorinkubation der  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Reduktion des Tryptophan und eine stärkere Wirkung der Metabolite erzeugen sollte.

Eine Möglichkeit immunsupprimierende Effekte der IDO Aktivität zu überwinden, wäre der Einsatz von Inhibitoren des Enzyms. Indem PDAC Zellen vor Zugabe von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit den Inhibitoren inkubiert wurden, wurde ihre Wirksamkeit im Rahmen dieser Arbeit in Zytotoxizitätstests überprüft (Abschnitt 4.3.3 und 4.5.1). Die eingesetzten IDO Inhibitoren wirkten sich unterschiedlich auf den Zelltod und die Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus. Im Gegensatz zu Tenatoprazol und 680C91 induzierten 1-D/L-MT in niedrigen Einsatzkonzentrationen keinen Zelltod in PDAC Zellen und konnten daher auf Grund ihrer Kompatibilität im RTCA System verwendet werden. In diesen Versuchen wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem PAg BrHPP oder dem *tribody* [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] restimuliert, die beide zu einer Verstärkung der Lysekapazität gegenüber in Medium kultivierten Zellen führten. Wenn auch eine Stimulation mit dem Letzteren die stärkere  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelte Lyse bewirkte, so war sie doch nie vollständig und variierte zwischen den einzelnen PDAC Zelllinien wie bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben (Oberge et al. 2014b). Eine gesteigerte Lysefähigkeit der mit [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte durch die Zugabe des IDO Inhibitors unabhängig des verwendeten Stereoisomers beobachtet werden. Ein additiver Effekt der Inhibitoren trat nicht auf. Während die Wirksamkeit von 1-L-MT vor allem auf die direkte Inhibition des Enzyms IDO1 zurückgeführt wird, gehen immer mehr Studien davon aus, dass das bevorzugte Ziel von 1-D-MT nicht wie ehemals angenommen IDO2 ist (Austin et al. 2015; Metz et al. 2007). Metz und Kollegen beschrieben, dass der IDO/TDO vermittelte Tryptophanmangel nicht nur über die Aktivierung der GCN-2 Kinase immunsuppressiv wirkt, sondern auch durch die Inhibition des Wachstumsproteins mTOR (engl. *mechanistic target of Rapamycin*) und der T-Zell regulierenden Protein Kinase C-theta (PKC- $\Theta$ ) (Metz et al. 2012). Unterstützt werden die Erkenntnisse durch die Beobachtung, dass 1-D-MT im Stande ist, die Inhibition von mTOR zu beenden und nicht länger Autophagie in Zervixkarzinomzellen zu induzieren (Metz et al. 2012). Die Fähigkeit Tryptophan unabhängig vom jeweiligen Isoenzym nachzuahmen, könnte also die Wirksamkeit von 1-D-MT begründen. Des Weiteren könnte 1-D/L-MT den Tryptophan Transport über die Membran beeinflussen, sowohl durch Inhibition des Influx als auch Stimulation des Efflux von Transportsystem L (Travers et al.

2004; Kudo et al. 2001). In Anbetracht des derzeitig anerkannten Wirkprofils der unterschiedlichen Inhibitoren deutet die Steigerung der Lysefähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen unabhängig des verwendeten Stereoisomers darauf hin, dass die immunsupprimierenden Effekte des Enzyms hauptsächlich von IDO1 vermittelt werden ähnlich den Beobachtungen von Metz und Kollegen (Metz et al. 2007).

Um zudem eine PGE<sub>2</sub> vermittelte Resistenz in Colo357 Zellen zu überwinden, wurden Zytotoxizitätstests mit Kombinationen der IDO und COX2 Inhibitoren durchgeführt. Der COX2 Inhibitor übertraf allerdings die durch IDO Inhibitoren bedingte Steigerung der Lyse, die auch eine Kombination aus COX2 und IDO Inhibitoren nicht erhöhte. Dies könnte mit einer Abschwächung der IDO Aktivität durch Inhibition der COX2, welche die Wirksamkeit des IDO Inhibitors reduziert, erklärt werden (Chen et al. 2014). Eine supprimierende Wirkung von COX2 Inhibitoren auf die IDO Transkription und die katalytische Aktivität in humanen leukämischen Zellen sowie auf die Reduktion einer Konversion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs wurde bereits beschrieben (Iachininoto et al. 2013). In *in vivo* Experimenten mit COX2 überexprimierenden MCF-7 Zellen führte hingegen der Einsatz von sowohl IDO als auch COX2 Inhibitoren am effektivsten zur Reduktion des Tumorwachstums und war dem alleinigen Einsatz des COX2 Inhibitors überlegen (Chen et al. 2014). Um eine Quantifizierung der endogenen Freisetzung von Kynurenin zu ermöglichen, sollte sich diesen Versuchen die weiterführende Überprüfung der enzymatischen IDO Aktivität durch Einsatz der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie anschließen.

Eine Möglichkeit nicht nur Daten über die Stimulation und Lyse der Zielzellen zu erlangen, sondern die Aktivität der Effektorzellen kurz nach ihrer Stimulation darzustellen, bietet der CD107a Test. Ursprünglich als Marker für die Aktivität von CD8<sup>+</sup> und NK Zellen beschrieben, ist er auch in der Lage Membranproteine zu detektieren, die während der Degranulation transient auf der Zelloberfläche von  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert werden (Betts et al. 2003; Alter et al. 2004; Tuero et al. 2016). Hierbei korreliert die Stärke der CD107a Expression mit der Menge der zytotoxischen Granula (Betts et al. 2003). Es ist anzumerken, dass in den Experimenten neben der Stimulation durch Tumorantigene auch eine unspezifische Antwort auf Peptide in Medium beobachtet wurde. Unabhängig des Stimulanz konnte ein

inhibitorischer Effekt von Kynurenin auf die CD107a Expression festgestellt werden, der stärker ausfiel, wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem Metabolit vorinkubiert. Die Vorinkubation könnte hierbei die Adaptation des Stoffwechsels mit einem geringeren Tryptophanspiegel und höherer Ansammlung des Kynurenins bewirkt haben. In ersten Versuchen mit der Zugabe von 1-D/L-MT konnte die CD107a Expression der  $\gamma\delta$  T-Zellen gesteigert werden. Die Fluoreszenzintensitätsdaten liefern somit Hinweise darauf, dass Kynurenin die Fähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu degranulieren einschränkt.

### 5.3 Ausblicke

Ein Grund für den geringen Einfluss bisheriger Therapieansätze auf die mediane Gesamtüberlebensrate der Pankreaskarzinompatienten ist die Resistenz gegenüber einer Radio- und Chemotherapie (Belli et al. 2013; Krantz et al. 2017). Die Mechanismen dieser Resistenz sind nur in Teilen erforscht und verstanden. So beobachteten beispielsweise Vareki und Kollegen eine Akkumulation humaner Tumorzellen in der G1 Phase des Zellzyklus unter Einfluss der Indolamin-2,3-Dioxygenase und vermuteten eine durch diesen Zellzyklusarrest bedingte verringerte Sensitivität der Zellen für Radiation und das Chemotherapeutikum Cisplatin (Maleki Vareki et al. 2014). Des Weiteren wurde eine starke Aktivität JAK/STAT undIDO vermittelter Signalwege, die die Proliferation von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in (Ko)kultur reduzierte, vor allem in multiresistenten und nicht in therapiesensitiven Karzinomzelllinien beobachtet (Campia et al. 2015). Diese Forschungsergebnisse bestätigen die Rolle von IDO als Resistenzmechanismus in der Krebstherapie. Hinzu kommt, dass die Wirkung zugelassener Therapeutika wie gegen CTLA-4 gerichteter Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren und die Wirkung des Proteinkinaseinhibitors Imatinib zum Teil durch die Inhibition von IDO erklärt werden (Grohmann et al. 2002; Holmgaard et al. 2013; Balachandran et al. 2011). Die Kombination von Imatinib mit immunmodulatorischen monoklonalen Antikörpern, die auf T-Zellen vorhanden und gegen inhibitorische Moleküle wie z.B. CTLA-4 oder *programmed death receptor 1* (PD-1) gerichtet sind, wird in prä-/klinischen Studien an Patienten mit z.B. gastrointestinalem Stromatumor oder Melanom untersucht (D'Angelo et al. 2017; Reilley et al. 2017; Seifert et al. 2017). Die bereits bestehende Wirksamkeit antitumoröser Therapien könnte so verbessert und

aufkommende Resistenzen überwunden werden (Balachandran et al. 2011; Tan et al. 2015; Seifert et al. 2017). Des Weiteren ermöglichen Nanotechnologie-basierte Ansätze die Konjugation von IDO Inhibitoren in Phospholipide und Lipiddoppelschichten einzelner Vesikel. Dies könnte den zielgerichteten Transport zu den PDAC beschleunigen, die intratumorale Konzentration des Therapeutikums erhöhen und seine Wirkdauer verlängern, um immunogenen Zelltod zu verstärken und die immunsupprimierenden Effekte von IDO aufzuheben (Lu et al. 2017).

Das immunsuppressive desmoplastische Tumorstroma des PDAC macht etwa 80 % der Tumormasse aus (Oberg et al. 2016). Unter anderem durch erschwerte Penetration zytotoxischer T-Lymphozyten in das Gewebe trägt es zum Versagen therapeutischer Maßnahmen bei (Abschnitt 1.1.1) (Oberg et al. 2016). Untersuchungen von Prof. Dr. Wesch und PD Dr. Oberg zeigten allerdings, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Lage sind die karzinomatösen Gänge des PDAC zu infiltrieren und die vorherrschenden Tumorzellen HLA unabhängig anzugreifen (Oberg et al. 2016). Die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte dabei durch Verwendung des *tribody* [(Her)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] gesteigert werden. Eine Weiterentwicklung des Antikörper-basierten Ansatzes stellen die Untersuchungen von de Bruin und Kollegen dar. Ihnen gelang es, einen gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TZR gerichteten Antikörper bestehend aus nur einer Domäne zu generieren (Bruin et al. 2016). Dieser aus Schwerantikörpern einer Kamelart generierte Antikörper bietet auf Grund seiner Größe die Möglichkeit besserer Gewebepenetration als bisherige Antikörper. Seine geringe Immunogenität reduzierte *in vitro* die Produktion inflammatorischer Zytokine in mit PAg stimulierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen und könnte dazu beitragen *in vivo* ungewollt aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen zu neutralisieren, um inflammatorische Nebenwirkungen und Resistenzen zu minimieren (Bruin et al. 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Metabolite von IDO die Resistenz der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse in PDAC Zellen verstärken. Dieser Mechanismus kann durch die Inhibition des Enzyms reduziert werden. Ferner ergänzen sie die Daten von Gonnermann und Kollegen, dass die synergistische Applikation von COX2 und IDO Inhibitoren zusammen mit dem *tribody* [(Her)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] *in vitro* keine zusätzliche Steigerung der Zytotoxizität in  $\gamma\delta$  T-Zellen

hervorrufen (Gonnermann et al. 2015). Die komplexe Rolle von IDO in der Entwicklung einer Immunantwort ist bisher noch nicht geklärt und bedarf einer weiteren Untersuchung. Die über die GCN-2 Kinase vermittelte T-Zell Suppression konnte in einer *in vivo* Studie beispielsweise nicht bestätigt werden und deutet auf eine stärkere Beteiligung akkumulierender Metabolite an der T-Zell Suppression hin (Sonner et al. 2016). Bisherige Untersuchungen IDO exprimierender humaner PDAC widersprechen sich zudem in der prognostischen Bedeutung von IDO (Sideras et al. 2017; Zhang et al. 2017). Es bedarf also weiterer Untersuchungen, die sich mit der Selektion IDO exprimierender Gewebe und der Analyse des Tryptophan und Kynureninspiegels in Patienten befassen, um die Patienten zu identifizieren, die am meisten von einer gegen IDO gerichteten Therapie profitieren (Platten et al. 2014).

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte die Überexpression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welches beim Abbau von Tryptophan eine entscheidende Rolle spielt, als ein Resistenzmechanismus von duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) Zelllinien gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse untersucht werden. Ziel der Experimente war zu untersuchen, inwiefern eine IDO Überexpression in PDAC Zellen oder die Zugabe von IDO Metaboliten wie Kynurenin und Picolinsäure, welche in einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung akkumulieren können, die zytotoxische Kapazität von  $\gamma\delta$  T-Zellen beeinflusst.

Es konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass das Kynurenin jedoch nicht Picolinsäure die Lyse von PDAC Zelllinien durch  $\gamma\delta$  T-Zellen inhibiert, indem es die Degranulation von Granzymen und Perforinen in  $\gamma\delta$  T-Zellen reduziert. Die Beeinflussung der zytotoxischen Kapazität der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gegenüber PDAC Zellen wurde mit Hilfe des xCELLigence Systems und einem CD107a Degranulationstest überprüft. Zusätzlich wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch im Western Blot in der gegenüber einer  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse resistenten PDAC Zelllinie Colo357 eine starke Expression von IDO1 und 2 nachgewiesen, wohingegen die besser lysierbaren Zelllinien Panc89 und PancTu-I eine schwächere Expression von IDO1 und 2 aufzeigten.

Durch den Einsatz des IDO1 Inhibitors 1-Methyl-Dextro-Tryptophan (1-D-MT) oder des IDO und TDO (Tryptophan-2,3-Dioxygenase) Inhibitors 1-Methyl-Levo-Tryptophan (1-L-MT) konnte die Lyse von PancTu-I und Colo357 Zellen durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gesteigert werden. Im Vergleich erhöhte der Einsatz von Cyclooxygenase 2 (COX2) Inhibitoren die beobachtete Lysekapazität der  $\gamma\delta$  T-Zellen stärker als der Einsatz von IDO Inhibitoren in Gegenwart von Colo357 Zellen. Die Anwendung von COX2 und IDO Inhibitoren zusammen bewirkte keine zusätzliche Steigerung der Zytotoxizität von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten.

Des Weiteren wurden erste Hinweise gefunden, dass die Überexpression des Enzyms IDO in PDAC Zelllinien auf Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zurückzuführen ist, welches  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach

(Ko)kultur mit PDAC Zellen vermehrt produzieren und, dass diese immunsupprimierende Wirkung durch Inhibitoren des Enzyms aufgehoben werden kann.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass IDO in PDAC Zellen immunsuppressiv wirkt. Außerdem ist der Einsatz von IDO Inhibitoren ein Weg, um die Kynurenin vermittelte Resistenz von PDAC Zellen gegenüber der  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelten Lyse zu schwächen. Im Kontext einer  $\gamma\delta$  T-Zell basierten Immuntherapie ist die heterogene IDO Expression innerhalb des PDAC von Interesse, um individuelle diagnostische und prognostische Marker einer personalisierten Medizin zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Aufschluss darüber, dass die Inhibition enzymatisch wirkender *immune escape* Mechanismen Resistenzen überwinden und in Kombination mit bispezifischen Antikörper Konstrukten die Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen steigern kann.



## 7. Literaturverzeichnis

- Adams, E. J.; Gu, S.; Luoma, A. M. (2015): Human gamma delta T cells. *Cellular Immunology*, 296, 31–40.
- Allison, T. J.; Winter, C. C.; Fournié, J. J.; Bonneville, M.; Garboczi, D. N. (2001): Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature*, 411, 820–824.
- Alter, G.; Malenfant, J. M.; Altfeld, M. (2004): CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 294, 15–22.
- Andersen, M. Hald; Schrama, D.; Thor Straten, P.; Becker, J. C. (2006): Cytotoxic T cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126, 32–41.
- Antony, P. A.; Paulos, C. M.; Ahmadzadeh, M.; Akpınarli, A.; Palmer, D. C.; Sato, N.; Kaiser, A.; Hinrichs, C. S.; Heinrichs, C.; Klebanoff, C. A.; Tagaya, Y.; Restifo, N. P. (2006): Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *Journal of Immunology*, 176, 5255–5266.
- Asghar, K.; Farooq, A.; Zulfiqar, B.; Rashid, M. Usman (2017): Indoleamine 2,3-dioxygenase: As a potential prognostic marker and immunotherapeutic target for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 23, 2286–2293.
- Austin, C. J. D.; Rendina, L. M. (2015): Targeting key dioxygenases in tryptophan-kynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy. *Drug Discovery Today*, 20, 609–617.
- Ayyar, B. Vijayalakshmi; Arora, S.; O'Kennedy, R. (2016): Coming-of-Age of antibodies in cancer therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37, 1009–1028.
- Bakmiwewa, S. M.; Fatokun, A. A.; Tran, A.; Payne, R. J.; Hunt, N. H.; Ball, H. J. (2012): Identification of selective inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 7641–7646.
- Balachandran, V. P.; Cavnar, M. J.; Zeng, S.; Bamboat, Z. M.; Ocuin, L. M.; Obaid, H.; Sorenson, E. C.; Popow, R.; Ariyan, C.; Rossi, F.; Besmer, P.; Guo, T.; Antonescu, C. R.; Taguchi, T.; Yuan, J.; Wolchok, J. D.; Allison, J. P.; DeMatteo, R. P. (2011): Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nature Medicine*, 17, 1094–1100.
- Beetz, S.; Wesch, D.; Marischen, L.; Welte, S.; Oberg, H.-H.; Kabelitz, D. (2008): Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology*, 213, 173–182.
- Belli, C.; Cereda, S.; Anand, S.; Reni, M. (2013): Neoadjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 39, 518–524.
- Benjamin, J. E.; Stein, A. S. (2016): The role of blinatumomab in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 7, 142–156.

Benzaïd, I.; Mönkkönen, H.; Stresing, V.; Bonnelye, E.; Green, J.; Mönkkönen, J.; Touraine, J.-L.; Clézardin, P. (2011): High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer Research*, 71, 4562–4572.

Betts, M. R.; Brenchley, J. M.; Price, D. A.; Rosa, S. C. de; Douek, D. C.; Roederer, M.; Koup, R. A. (2003): Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods*, 281, 65–78.

Bosetti, C.; Bertuccio, P.; Malvezzi, M.; Levi, F.; Chatenoud, L.; Negri, E.; La Vecchia, C. (2013): Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Annals of oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24, 2657–2671.

Bouet-Toussaint, F.; Cabillic, F.; Toutirais, O.; Le Gallo, M.; La Thomas de Pintièrre, C.; Daniel, P.; Genetet, N.; Meunier, B.; Dupont-Bierre, E.; Boudjema, K.; Catros, V. (2008): Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 57, 531–539.

Brandacher, G.; Perathoner, A.; Ladurner, R.; Schneeberger, S.; Obrist, P.; Winkler, C.; Werner, E. R.; Werner-Felmayer, G.; Weiss, H. G.; Göbel, G.; Margreiter, R.; Königsrainer, A.; Fuchs, D.; Amberger, A. (2006): Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clinical Cancer Research*, 12, 1144–1151.

Brandes, M.; Willmann, K.; Bioley, G.; Lévy, N.; Eberl, M.; Luo, M.; Tampé, R.; Lévy, F.; Romero, P.; Moser, B. (2009): Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 2307–2312.

Brinkmann, U.; Kontermann, R. E. (2017): The making of bispecific antibodies. *mAbs*, 9, 182–212.

Brochez, L.; Chevolet, I.; Kruse, V. (2017): The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *European Journal of Cancer*, 76, 167–182.

Brody, J. R.; Costantino, C. L.; Berger, A. C.; Sato, T.; Lisanti, M. P.; Yeo, C. J.; Emmons, R. V.; Witkiewicz, A. K. (2009): Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle*, 8, 1930–1934.

Bruin, R. C. G. de; Lougheed, S. M.; van der Kruk, L.; Stam, A. G.; Hooijberg, E.; Roovers, R. C.; van Bergen En Henegouwen, P. M. P.; Verheul, H. M. W.; Gruijl, T. D. de; van der Vliet, H. J. (2016): Highly specific and potently activating Vgamma9Vdelta2-T cell specific nanobodies for diagnostic and therapeutic applications. *Clinical Immunology*, 169, 128–138.

Bruin, R. C. G. de; Stam, A. G. M.; Vangone, A.; van Bergen En Henegouwen, P. M. P.; Verheul, H. M. W.; Sebestyén, Z.; Kuball, J.; Bonvin, A. M. J. J.; Gruijl, T. D. de; van der Vliet, H. J. (2017): Prevention of Vgamma9Vdelta2 T cell activation by a Vgamma9Vdelta2 TCR nanobody. *Journal of Immunology*, 198, 308–317.

Campia, I.; Buondonno, I.; Castella, B.; Rolando, B.; Kopecka, J.; Gazzano, E.; Ghigo, D.; Riganti, C. (2015): An autocrine cytokine/JAK/STAT-signaling induces kynurenine synthesis in multidrug resistant human cancer cells. *PLoS ONE*, 10, e0126159.

Chen, J.-Y.; Li, C.-F.; Kuo, C.-C.; Tsai, K. K.; Hou, M.-F.; Hung, W.-C. (2014): Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Research: BCR*, 16, 410.

Chen, L.; Flies, D. B. (2013): Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13, 227–242.

Chen, Y.; Guillemin, G. J. (2009): Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. *International Journal of Tryptophan Research: IJTR*, 2, 1–19.

Chien, Y.-h.; Meyer, C.; Bonneville, M. (2014):  $\gamma\delta$  T cells: first line of defense and beyond. *Annual Review of Immunology*, 32, 121–155.

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.

Chitadze, G.; Oberg, H.-H.; Wesch, D.; Kabelitz, D. (2017): The Ambiguous Role of  $\gamma\delta$  T Lymphocytes in Antitumor Immunity. *Trends in Immunology*, 38, 668–678.

Clendening, J. W.; Pandya, A.; Boutros, P. C.; El Ghamrasni, S.; Khosravi, F.; Trentin, G. A.; Martirosyan, A.; Hakem, A.; Hakem, R.; Jurisica, I.; Penn, L. Z. (2010): Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 15051–15056.

Collins-Burow, B.; Santos, E. S. (2007): Rituximab and its role as maintenance therapy in non-Hodgkin lymphoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 7, 257–273.

Constant, P.; Davodeau, F.; Peyrat, M. A.; Poquet, Y.; Puzo, G.; Bonneville, M.; Fournié, J. J. (1994): Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*, 264, 267–270.

Correia, D. V.; d'Orey, F.; Cardoso, B. A.; Lança, T.; Grosso, A. R.; deBarros, A.; Martins, L. R.; Barata, J. T.; Silva-Santos, B. (2009): Highly active microbial phosphoantigen induces rapid yet sustained MEK/Erk- and PI-3K/Akt-mediated signal transduction in anti-tumor human  $\gamma\delta$  T-cells. *PLoS ONE*, 4, e5657.

D'Angelo, S. P.; Shoushtari, A. N.; Keohan, M. Louise; Dickson, M. A.; Gounder, M. M.; Chi, P.; Loo, J. K.; Gaffney, L.; Schneider, L.; Patel, Z.; Erinjeri, J. Patrick; Bluth, M. J.; Sjoberg, A.; Streicher, H.; Takebe, N.; Qin, L.-X.; Antonescu, C.; DeMatteo, R. P.; Carvajal, R. D.; Tap, W. D. (2017): Combined KIT and CTLA-4 blockade in patients with refractory GIST and other advanced sarcomas. *Clinical Cancer Research*, 23, 2972–2980.

Davodeau, F.; Peyrat, M. A.; Gaschet, J.; Hallet, M. M.; Triebel, F.; Vié, H.; Kabelitz, D.; Bonneville, M. (1994): Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 180, 1685–1691.

Dempke, W. C. M.; Fenchel, K.; Uciechowski, P.; Dale, S. P. (2017): Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment-The more the better? *European Journal of Cancer*, 74, 55–72.

D'Haese, J. G.; Werner, J. (2016): Resektibilität des Pankreaskarzinoms. *Der Radiologe*, 56, 318–324.

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 Research*, 67, 7450–7457.

Ehrlich, P. (1913): Chemotherapie. Soziale Kultur und Volkswohlfahrt während der ersten 25 Regierungsjahre Kaiser Wilhelm II, 345–356. <http://www.pei.de/DE/institut/paul-ehrlich/publikationen-gesamtliste-paul-ehrlich/publikationen-gesamtliste-paul-ehrlich-node.html>. 15.07.2017.

Elliott, J. F.; Rock, E. P.; Patten, P. A.; Davis, M. M.; Chien, Y. H. (1988): The adult T-cell receptor delta-chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature*, 331, 627–631.

Eyerich, S.; Eyerich, K.; Pennino, D.; Carbone, T.; Nasorri, F.; Pallotta, S.; Cianfarani, F.; Odoriso, T.; Traidl-Hoffmann, C.; Behrendt, H.; Durham, S. R.; Schmidt-Weber, C. B.; Cavani, A. (2009): Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 3573–3585.

Fechter, K.; Dorransoro, A.; Jakobsson, E.; Ferrin, I.; Lang, V.; Sepulveda, P.; Pennington, D. J.; Trigueros, C. (2017): IFN $\gamma$  regulates activated V $\delta$ 2+ T cells through a feedback mechanism mediated by mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 12, e0169362.

Feig, C.; Gopinathan, A.; Neesse, A.; Chan, D. S.; Cook, N.; Tuveson, D. A. (2012): The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 18, 4266–4276.

Frumento, G.; Rotondo, R.; Tonetti, M.; Damonte, G.; Benatti, U.; Ferrara, G. Battista (2002): Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Experimental Medicine*, 196, 459–468.

Gerdtsen, A. Sandström; Wingren, C.; Persson, H.; Delfani, P.; Nordström, M.; Ren, H.; Wen, X.; Ringdahl, U.; Borrebaeck, C. A. K.; Hao, J. (2016): Plasma protein profiling in a stage defined pancreatic cancer cohort - Implications for early diagnosis. *Molecular Oncology*, 10, 1305–1316.

Girardi, M. (2006): Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126, 25–31.

Gober, H.-J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; Libero, G. de (2003): Human T cell receptor  $\gamma\delta$  cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197, 163–168.

Godin-Ethier, J.; Hanafi, L.-A.; Piccirillo, C. A.; Lapointe, R. (2011): Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clinical Cancer Research*, 17, 6985–6991.

Gogoi, D.; Chiplunkar, S. V. (2013): Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research*, 138, 755–761.

Golubovskaya, V.; Wu, L. (2016): Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers*, 8, 36.

Gonnermann, D.; Oberg, H.-H.; Kellner, C.; Peipp, M.; Sebens, S.; Kabelitz, D.; Wesch, D. (2015): Resistance of cyclooxygenase-2 expressing pancreatic ductal adenocarcinoma cells against  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 4, e988460.

Grohmann, U.; Orabona, C.; Fallarino, F.; Vacca, C.; Calcinaro, F.; Falorni, A.; Candeloro, P.; Belladonna, M. L.; Bianchi, R.; Fioretti, M. C.; Puccetti, P. (2002): CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology*, 3, 1097–1101.

Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; Vries, J. E. de; Roncarolo, M. G. (1997): A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389, 737–742.

Hannani, D.; Ma, Y.; Yamazaki, T.; Déchanet-Merville, J.; Kroemer, G.; Zitvogel, L. (2012): Harnessing  $\gamma\delta$  T cells in anticancer immunotherapy. *Trends in Immunology*, 33, 199–206.

Helm, O.; Mennrich, R.; Petrick, D.; Goebel, L.; Freitag-Wolf, S.; Röder, C.; Kalthoff, H.; Röcken, C.; Sipos, B.; Kabelitz, D.; Schäfer, H.; Oberg, H.-H.; Wesch, D.; Sebens, S. (2014): Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 9, e94357.

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. *Journal of Immunology*, 188, 1708–1716.

Holmgaard, R. B.; Zamarin, D.; Munn, D. H.; Wolchok, J. D.; Allison, J. P. (2013): Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 210, 1389–1402.

Huber, M.; Lohoff, M. (2015): Change of paradigm. *Allergo Journal International*, 24, 8–15.

Iachininoto, M. Grazia; Nuzzolo, E. Rosa; Bonanno, G.; Mariotti, A.; Procoli, A.; Locatelli, F.; Cristofaro, R. de; Rutella, S. (2013): Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition constrains indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in acute myeloid leukaemia cells. *Molecules*, 18, 10132–10145.

Ilic, M.; Ilic, I. (2016): Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22, 9694–9705.

Inman, K. S.; Francis, A. A.; Murray, N. R. (2014): Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 11160–11181.

Ino, Y.; Yamazaki-Itoh, R.; Shimada, K.; Iwasaki, M.; Kosuge, T.; Kanai, Y.; Hiraoka, N. (2013): Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 108, 914–923.

Ishiguro, T.; Sano, Y.; Komatsu, S.-I.; Kamata-Sakurai, M.; Kaneko, A.; Kinoshita, Y.; Shiraiwa, H.; Azuma, Y.; Tsunenari, T.; Kayukawa, Y.; Sonobe, Y.; Ono, N.; Sakata, K.; Fujii, T.; Miyazaki, Y.; Noguchi, M.; Endo, M.; Harada, A.; Frings, W.; Fujii, E.; Nanba, E.; Narita, A.; Sakamoto, A.; Wakabayashi, T.; Konishi, H.; Segawa, H.; Igawa, T.; Tsushima, T.; Mutoh, H.; Nishito, Y.; Takahashi, M.; Stewart, L.; ElGabry, E.; Kawabe, Y.; Ishigai, M.; Chiba, S.; Aoki, M.; Hattori, K.; Nezu, J. (2017): An anti-glypican 3/CD3 bispecific T cell-redirecting antibody for treatment of solid tumors. *Science Translational Medicine*, 9, eaa14291.

Isla Larrain, M. T.; Rabassa, M. E.; Lacunza, E.; Barbera, A.; Cretón, A.; Segal-Eiras, A.; Croce, M. V. (2014): IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. *Tumor Biology*, 35, 6511–6519.

Janeway, C. A.; Jones, B.; Hayday, A. (1988): Specificity and function of T cells bearing  $\gamma\delta$  receptors. *Immunology Today*, 9, 73–76.

Jazirehi, A. R.; Kurdistani, S. K.; Economou, J. S. (2014): Histone deacetylase inhibitor sensitizes apoptosis-resistant melanomas to cytotoxic human T lymphocytes through regulation of TRAIL/DR5 pathway. *Journal of Immunology*, 192, 3981–3989.

Kabelitz, D. (2016): Human  $\gamma\delta$  T cells. *Clinical Immunology*, 172, 90–97.

Kabelitz, D.; Peters, C.; Wesch, D.; Oberg, H.-H. (2013): Regulatory functions of  $\gamma\delta$  T cells. *International Immunopharmacology*, 16, 382–387.

Kabelitz, D.; Wesch, D.; Pitters, E.; Zoller, M. (2004): Characterization of tumor reactivity of human Vg9Vd2 T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *The Journal of Immunology*, 173, 6767–6776.

Kantarjian, H.; Stein, A.; Gökbuget, N.; Fielding, A. K.; Schuh, A. C.; Ribera, J.-M.; Wei, A.; Dombret, H.; Foà, R.; Bassan, R.; Arslan, Ö.; Sanz, M. A.; Bergeron, J.; Demirkan, F.; Lech-Maranda, E.; Rambaldi, A.; Thomas, X.; Horst, H.-A.; Brüggemann, M.; Klapper, W.; Wood, B. L.; Fleishman, A.; Nagorsen, D.; Holland, C.; Zimmerman, Z.; Topp, M. S. (2017): Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 376, 836–847.

Kaper, T.; Looger, L. L.; Takanaga, H.; Platten, M.; Steinman, L.; Frommer, W. B. (2007): Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. *PLoS Biology*, 5, e257.

Kazen, A. R.; Adams, E. J. (2011): Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, E332-40.

Kistowska, M.; Rossy, E.; Sansano, S.; Gober, H.-J.; Landmann, R.; Mori, L.; Libero, G. de (2008): Dysregulation of the host mevalonate pathway during early bacterial infection activates human TCR gamma delta cells. *European Journal of Immunology*, 38, 2200–2209.

Kleeff, J.; Beckhove, P.; Esposito, I.; Herzig, S.; Huber, P. E.; Löhr, J. Matthias; Friess, H. (2007): Pancreatic cancer microenvironment. *International Journal of Cancer*, 121, 699–705.

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 Immunology, Immunotherapy: CII*, 60, 1075–1084.

Krantz, B. A.; Yu, K. H.; O'Reilly, E. M. (2017): Pancreas adenocarcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 6, 30.

Kudo, Y.; Boyd, C. A. (2001): The role of L-tryptophan transport in L-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants. *The Journal of Physiology*, 531, 417–423.

Kuol, N.; Stojanovska, L.; Nurgali, K.; Apostolopoulos, V. (2017): The mechanisms tumor cells utilize to evade the host's immune system. *Maturitas*, 105, 8–15.

Legut, M.; Cole, D. K.; Sewell, A. K. (2015): The promise of  $\gamma\delta$  T cells and the  $\gamma\delta$  T cell receptor for cancer immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 12, 656–668.

Litzenburger, U. M.; Opitz, C. A.; Sahm, F.; Rauschenbach, K. J.; Trump, S.; Winter, M.; Ott, M.; Ochs, K.; Lutz, C.; Liu, X.; Anastasov, N.; Lehmann, I.; Höfer, T.; Deimling, A. von; Wick, W.; Platten, M. (2014): Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*, 5, 1038–1051.

Liu, Y.; Liang, X.; Yin, X.; Lv, J.; Tang, K.; Ma, J.; Ji, T.; Zhang, H.; Dong, W.; Jin, X.; Chen, D.; Li, Y.; Zhang, S.; Xie, H. Q.; Zhao, B.; Zhao, T.; Lu, J.; Hu, Z.-W.; Cao, X.; Qin, F. Xiao-Feng; Huang, B. (2017): Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- $\gamma$ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells. *Nature Communications*, 8, 15207.

Löb, S.; Königsrainer, A.; Zieker, D.; Brücher, B. L. D. M.; Rammensee, H.-G.; Opelz, G.; Terness, P. (2009): IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 58, 153–157.

Lu, J.; Liu, X.; Liao, Y.-P.; Salazar, F.; Sun, B.; Jiang, W.; Chang, C. Hyun; Jiang, J.; Wang, X.; Wu, A. M.; Meng, H.; Nel, A. E. (2017): Nano-enabled pancreas cancer immunotherapy using immunogenic cell death and reversing immunosuppression. *Nature Communications*, 8, 1811.

Macchiarulo, A.; Camaioni, E.; Nuti, R.; Pellicciari, R. (2009): Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. *Amino Acids*, 37, 219–229.

Maleki Vareki, S.; Rytelowski, M.; Figueredo, R.; Di Chen; Ferguson, P. J.; Vincent, M.; Min, W.; Zheng, X.; Koropatnick, J. (2014): Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates immune-independent human tumor cell resistance to olaparib, gamma radiation, and cisplatin. *Oncotarget*, 5, 2778–2791.

Martinet, L.; Fleury-Cappellesso, S.; Gadelorge, M.; Dietrich, G.; Bourin, P.; Fournié, J.-J.; Poupot, R. (2009): A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*, 39, 752–762.

Meininger, D.; Zalameda, L.; Liu, Y.; Stepan, L. P.; Borges, L.; McCarter, J. D.; Sutherland, C. L. (2011): Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 1947–1954.

Melief, S. M.; Visser, M.; van der Burg, S. H.; Verdegaal, E. M. E. (2017): IDO and galectin-3 hamper the ex vivo generation of clinical grade tumor-specific T cells for adoptive cell therapy in metastatic melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 66, 913–926.

Meraviglia, S.; Eberl, M.; Vermijlen, D.; Todaro, M.; Buccheri, S.; Cicero, G.; La Mendola, C.; Guggino, G.; D'Asaro, M.; Orlando, V.; Scarpa, F.; Roberts, A.; Caccamo, N.; Stassi, G.; Dieli, F.; Hayday, A. C. (2010): In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 161, 290–297.

Metz, R.; Duhadaway, J. B.; Kamasani, U.; Laury-Kleintop, L.; Muller, A. J.; Prendergast, G. C. (2007): Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Research*, 67, 7082–7087.

Metz, R.; Rust, S.; Duhadaway, J. B.; Mautino, M. R.; Munn, D. H.; Vahanian, N. N.; Link, C. J.; Prendergast, G. C. (2012): IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR. *Oncoimmunology*, 1, 1460–1468.

Mezrich, J. D.; Fechner, J. H.; Zhang, X.; Johnson, B. P.; Burlingham, W. J.; Bradfield, C. A. (2010): An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 185, 3190–3198.

Morris, J. P.; Wang, S. C.; Hebrok, M. (2010): KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 10, 683–695.

Morrison, S. L. (2007): Two heads are better than one. *Nature Biotechnology*, 25, 1233–1234.

Muller, A. J.; Duhadaway, J. B.; Donover, P. Scott; Sutanto-Ward, E.; Prendergast, G. C. (2005): Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Medicine*, 11, 312–319.



- Munn, D. H.; Mellor, A. L. (2016): IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends in Immunology*, 37, 193–207.
- Munn, D. H.; Shafizadeh, E.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Pashine, A.; Mellor, A. L. (1999): Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of Experimental Medicine*, 189, 1363–1372.
- Munn, D. H.; Sharma, M. D.; Lee, J. R.; Jhaver, K. G.; Johnson, T. S.; Keskin, D. B.; Marshall, B.; Chandler, P.; Antonia, S. J.; Burgess, R.; Slingluff, C. L.; Mellor, A. L. (2002): Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, 297, 1867–1870.
- Murphy, K. M.; Travers, P.; Walport, M. (2014): *Janeway Immunologie*. 7. Auflage, korrigierter Nachdruck 2014, Springer Spektrum, Berlin und Heidelberg.
- Murphy, K. P.; Weaver, C.; Janeway, C. (2017): *Janeway's immunobiology*. 9th edition, Garland Science, New York and Abingdon (UK).
- Nesse, A.; Algül, H.; Tuveson, D. A.; Gress, T. M. (2015): Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut*, 64, 1476–1484.
- Neoptolemos, J. P.; Stocken, D. D.; Friess, H.; Bassi, C.; Dunn, J. A.; Hickey, H.; Beger, H.; Fernandez-Cruz, L.; Dervenis, C.; Lacaïne, F.; Falconi, M.; Pederzoli, P.; Pap, A.; Spooner, D.; Kerr, D. J.; Büchler, M. W. (2004): A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350, 1200–1210.
- Ness-Schwickerath, K. J.; Morita, C. T. (2011): Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68, 2371–2390.
- Nicol, A. J.; Tokuyama, H.; Mattarollo, S. R.; Hagi, T.; Suzuki, K.; Yokokawa, K.; Nieda, M. (2011): Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer*, 105, 778–786.
- Noguchi, A.; Kaneko, T.; Kamigaki, T.; Fujimoto, K.; Ozawa, M.; Saito, M.; Ariyoshi, N.; Goto, S. (2011): Zoledronate-activated  $V\gamma 9\gamma\delta$  T cell-based immunotherapy is feasible and restores the impairment of  $\gamma\delta$  T cells in patients with solid tumors. *Cytotherapy*, 13, 92–97.
- Oberg, H.-H.; Grage-Griebenow, E.; Adam-Klages, S.; Jerg, E.; Peipp, M.; Kellner, C.; Petrick, D.; Gonnermann, D.; Freitag-Wolf, S.; Röcken, C.; Sebens, T.; Vogel, I.; Becker, T.; Ebsen, M.; Kabelitz, D.; Wesch, D.; Sebens, S. (2016): Monitoring and functional characterization of the lymphocytic compartment in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreatology*, 16, 1069–1079.
- Oberg, H.-H.; Kellner, C.; Gonnermann, D.; Peipp, M.; Peters, C.; Sebens, S.; Kabelitz, D.; Wesch, D. (2015):  $\gamma\delta$  T cell activation by bispecific antibodies. *Cellular Immunology*, 296, 41–49.

Oberg, H.-H.; Kellner, C.; Peipp, M.; Sebens, S.; Adam-Klages, S.; Gramatzki, M.; Kabelitz, D.; Wesch, D. (2014a): Monitoring circulating  $\gamma\delta$  T cells in cancer patients to optimize  $\gamma\delta$  T cell-based immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 5, 643.

Oberg, H.-H.; Peipp, M.; Kellner, C.; Sebens, S.; Krause, S.; Petrick, D.; Adam-Klages, S.; Rocken, C.; Becker, T.; Vogel, I.; Weisner, D.; Freitag-Wolf, S.; Gramatzki, M.; Kabelitz, D.; Wesch, D. (2014b): Novel bispecific antibodies increase gammadelta T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 74, 1349–1360.

Opitz, C. A.; Litzenburger, U. M.; Sahm, F.; Ott, M.; Tritschler, I.; Trump, S.; Schumacher, T.; Jestaedt, L.; Schrenk, D.; Weller, M.; Jugold, M.; Guillemin, G. J.; Miller, C. L.; Lutz, C.; Radlwimmer, B.; Lehmann, I.; Deimling, A. von; Wick, W.; Platten, M. (2011): An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478, 197–203.

Ozaki, Y.; Edelstein, M. P.; Duch, D. S. (1988): Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1242–1246.

Pallotta, M. T.; Orabona, C.; Volpi, C.; Vacca, C.; Belladonna, M. L.; Bianchi, R.; Servillo, G.; Brunacci, C.; Calvitti, M.; Biccato, S.; Mazza, E. M. C.; Boon, L.; Grassi, F.; Fioretti, M. C.; Fallarino, F.; Puccetti, P.; Grohmann, U. (2011): Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature Immunology*, 12, 870–878.

Petrasca, A.; Doherty, D. G. (2014): Human V $\delta$ 2(+)  $\gamma\delta$  T Cells differentially induce maturation, cytokine production, and alloreactive T cell stimulation by dendritic cells and B cells. *Frontiers in Immunology*, 5, 650.

Petricevic, B.; Laengle, J.; Singer, J.; Sachet, M.; Fazekas, J.; Steger, G.; Bartsch, R.; Jensen-Jarolim, E.; Bergmann, M. (2013): Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 11, 307.

Pietschmann, K.; Beetz, S.; Welte, S.; Martens, I.; Gruen, J.; Oberg, H.-H.; Wesch, D.; Kabelitz, D. (2009): Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 70, 245–255.

Pilotte, L.; Larrieu, P.; Stroobant, V.; Colau, D.; Dolusic, E.; Frédérick, R.; Plaen, E. de; Uyttenhove, C.; Wouters, J.; Masereel, B.; van den Eynde, B. J. (2012): Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 2497–2502.

Plank, M. W.; Kaiko, G. E.; Maltby, S.; Weaver, J.; Tay, H. L.; Shen, W.; Wilson, M. S.; Durum, S. K.; Foster, P. S. (2017): Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *Journal of Immunology*, 198, 2182–2190.

Platten, M.; Knebel Doeberitz, N. von; Oezen, I.; Wick, W.; Ochs, K. (2014): Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors. *Frontiers in Immunology*, 5, 673.

Poruk, K. E.; Gay, D. Z.; Brown, K.; Mulvihill, J. D.; Boucher, K. M.; Scaife, C. L.; Firpo, M. A.; Mulvihill, S. J. (2013): The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Current Molecular Medicine*, 13, 340–351.

Poruk, K. E.; Valero, V.; Saunders, T.; Blackford, A. L.; Griffin, J. F.; Poling, J.; Hruban, R. H.; Anders, R. A.; Herman, J.; Zheng, L.; Rasheed, Z. A.; Laheru, D. A.; Ahuja, N.; Weiss, M. J.; Cameron, J. L.; Goggins, M.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Wood, L. D.; Wolfgang, C. L. (2016): Circulating tumor cell phenotype predicts recurrence and survival in pancreatic adenocarcinoma. *Annals of Surgery*, 264, 1073–1081.

Prendergast, G. C.; Smith, C.; Thomas, S.; Mandik-Nayak, L.; Laury-Kleintop, L.; Metz, R.; Muller, A. J. (2014): Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 63, 721–735.

Ravens, S.; Schultze-Florey, C.; Raha, S.; Sandrock, I.; Drenker, M.; Oberdörfer, L.; Reinhardt, A.; Ravens, I.; Beck, M.; Geffers, R.; Kaisenberg, C. von; Heuser, M.; Thol, F.; Ganser, A.; Förster, R.; Koenecke, C.; Prinz, I. (2017): Human  $\gamma\delta$  T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nature Immunology*, 18, 393–401.

Reilly, M. J.; Bailey, A.; Subbiah, V.; Janku, F.; Naing, A.; Falchook, G.; Karp, D.; Piha-Paul, S.; Tsimberidou, A.; Fu, S.; Lim, J.; Bean, S.; Bass, A.; Montez, S.; Vence, L.; Sharma, P.; Allison, J.; Meric-Bernstam, F.; Hong, D. S. (2017): Phase I clinical trial of combination imatinib and ipilimumab in patients with advanced malignancies. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5, 35.

Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2015): *Krebs in Deutschland 2011/2012*, 10. Ausgabe, Berlin.

Robinson, C. M.; Shirey, K. Ann; Carlin, J. M. (2003): Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 23, 413–421.

Roshani, R.; McCarthy, F.; Hagemann, T. (2014): Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 345, 157–163.

Russell, J. H.; Ley, T. J. (2002): Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of immunology*, 20, 323–370.

Sakaguchi, S. (2004): Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22, 531–562.

Sakamoto, M.; Nakajima, J.; Murakawa, T.; Fukami, T.; Yoshida, Y.; Murayama, T.; Takamoto, S.; Matsushita, H.; Kakimi, K. (2011): Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded  $\gamma\delta$ T cells. *Journal of Immunotherapy*, 34, 202–211.

Sandstrom, A.; Peigné, C.-M.; Léger, A.; Crooks, J. E.; Konczak, F.; Gesnel, M.-C.; Breathnach, R.; Bonneville, M.; 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.

Sato, N.; Kohi, S.; Hirata, K.; Goggins, M. (2016): Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy. *Cancer Science*, 107, 569–575.

Schatz, D. G. (2004): V(D)J recombination. *Immunological Reviews*, 200, 5–11.

Schmidt, S. V.; Schultze, J. L. (2014): New insights into IDO biology in bacterial and viral infections. *Frontiers in Immunology*, 5, 384.

Seifert, A. M.; Zeng, S.; Zhang, J. Q.; Kim, T. S.; Cohen, N. A.; Beckman, M. J.; Medina, B. D.; Maltbaek, J. H.; Loo, J. K.; Crawley, M. H.; Rossi, F.; Besmer, P.; Antonescu, C. R.; DeMatteo, R. P. (2017): PD-1/PD-L1 blockade enhances T-cell activity and antitumor efficacy of Imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23, 454–465.

Shen, Y.; Zhou, D.; Qiu, L.; Lai, X.; Simon, M.; Shen, L.; Kou, Z.; Wang, Q.; Jiang, L.; Estep, J.; Hunt, R.; Clagett, M.; Sehgal, P. K.; Li, Y.; Zeng, X.; Morita, C. T.; Brenner, M. B.; Letvin, N. L.; Chen, Z. W. (2002): Adaptive immune response of V $\gamma$ 2V $\delta$ 2+ T cells during mycobacterial infections. *Science*, 295, 2255–2258.

Sideras, K.; Biermann, K.; Yap, K.; Mancham, S.; Boor, P. P. C.; Hansen, B. E.; Stoop, H. J. A.; Peppelenbosch, M. P.; van Eijck, C. H.; Sleijfer, S.; Kwekkeboom, J.; Bruno, M. J. (2017): Tumor cell expression of immune inhibitory molecules and tumor-infiltrating lymphocyte count predict cancer-specific survival in pancreatic and ampullary cancer. *International Journal of Cancer*, 141, 572–582.

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. (2017): Cancer statistics, 2017. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 67, 7–30.

Silva-Santos, B.; Serre, K.; Norell, H. (2015):  $\gamma\delta$  T cells in cancer. *Nature Reviews. Immunology*, 15, 683–691.

Sipos, B.; Moser, S.; Kalthoff, H.; Torok, V.; Lohr, M.; Kloppel, G. (2003): A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*, 442, 444–452.

Slamon, D. J.; Godolphin, W.; Jones, L. A.; Holt, J. A.; Wong, S. G.; Keith, D. E.; Levin, W. J.; Stuart, S. G.; Udove, J.; Ullrich, A. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707–712.

Sonner, J. K.; Deumelandt, K.; Ott, M.; Thomé, C. M.; Rauschenbach, K. J.; Schulz, S.; Munteanu, B.; Mohapatra, S.; Adam, I.; Hofer, A.-C.; Feuerer, M.; Opitz, C. A.; Hopf, C.; Wick, W.; Platten, M. (2016): The stress kinase GCN2 does not mediate suppression of antitumor T cell responses by tryptophan catabolism in experimental melanomas. *Oncoimmunology*, 5, e1240858.

Stinchcombe, J. C.; Griffiths, G. M. (2007): Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 495–517.

Sutton, V. R.; Brennan, A. J.; Ellis, S.; Danne, J.; Thia, K.; Jenkins, M. R.; Voskoboinik, I.; Pejler, G.; Johnstone, R. W.; Andrews, D. M.; Trapani, J. A. (2016): Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates natural killer cell and cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity. *The FEBS Journal*, 283, 947–961.

Tan, Y.; Garcia-Buitrago, M. T.; Trent, J. C.; Rosenberg, A. E. (2015): The immune system and gastrointestinal stromal tumor. *Current Opinion in Oncology*, 27, 338–342.

Taylor, M. W.; Feng, G. S. (1991): Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5, 2516–2522.

Topp, M. S.; Gökbuget, N.; Zugmaier, G.; Klappers, P.; Stelljes, M.; Neumann, S.; Viardot, A.; Marks, R.; Diedrich, H.; Faul, C.; Reichle, A.; Horst, H.-A.; Brüggemann, M.; Wessiepe, D.; Holland, C.; Alekar, S.; Mergen, N.; Einsele, H.; Hoelzer, D.; Bargou, R. C. (2014): Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32, 4134–4140.

Travers, M. T.; Gow, I. F.; Barber, M. C.; Thomson, J.; Shennan, D. B. (2004): Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1661, 106–112.

Tsiambas, E.; Karameris, A.; Dervenis, C.; Lazaris, A. C.; Giannakou, N.; Gerontopoulos, K.; Patsouris, E. (2006): HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis. *JOP: Journal of the Pancreas*, 7, 283–294.

Tuero, I.; Venzon, D.; Robert-Guroff, M. (2016): Mucosal and systemic  $\gamma\delta$ + T cells associated with control of simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Immunology*, 197, 4686–4695.

Ujiki, M. B.; Talamonti, M. S. (2005): Surgical management of pancreatic cancer. *Seminars in Radiation Oncology*, 15, 218–225.

Uyttenhove, C.; Pilotte, L.; Théate, I.; Stroobant, V.; Colau, D.; Parmentier, N.; Boon, T.; van den Eynde, B. J. (2003): Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine*, 9, 1269–1274.

Vantourout, P.; Hayday, A. (2013): Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*, 13, 88–100.

Varesio, L.; Clayton, M.; Blasi, E.; Ruffman, R.; Radzioch, D. (1990): Picolinic acid, a catabolite of tryptophan, as the second signal in the activation of IFN-gamma-primed macrophages. *Journal of Immunology*, 145, 4265–4271.

Veugelers, K.; Motyka, B.; Goping, I. Swie; Shostak, I.; Sawchuk, T.; Bleackley, R. Chris (2006): Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 623–633.

Vila-Navarro, E.; Vila-Casadesús, M.; Moreira, L.; Duran-Sanchon, S.; Sinha, R.; Ginés, À.; Fernández-Esparrach, G.; Miquel, R.; Cuatrecasas, M.; Castells, A.; Lozano, J. José; Gironella, M. (2017): MicroRNAs for detection of pancreatic neoplasia: biomarker discovery by next-generation sequencing and validation in 2 independent cohorts. *Annals of Surgery*, 265, 1226–1234.

Walch, M.; Dotiwala, F.; Mulik, S.; Thiery, J.; Kirchhausen, T.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Martinvalet, D.; Lieberman, J. (2014): Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granzysin-mediated delivery of granzymes. *Cell*, 157, 1309–1323.

Wesch, D.; Beetz, S.; Oberg, H.-H.; Marget, M.; Krenzel, K.; Kabelitz, D. (2006): Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 176, 1348–1354.

Wesch, D.; Glatzel, A.; Kabelitz, D. (2001): Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cellular Immunology*, 212, 110–117.

Wesch, D.; Peters, C.; Siegers, G. Melanie (2014): Human gamma delta T regulatory cells in cancer. *Frontiers in Immunology*, 5, 598.

Willcox, C. R.; Pitard, V.; Netzer, S.; Couzi, L.; Salim, M.; Silberzahn, T.; Moreau, J.-F.; Hayday, A. C.; Willcox, B. E.; Déchanet-Merville, J. (2012): Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human  $\gamma\delta$  T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nature Immunology*, 13, 872–879.

Witkiewicz, A.; Williams, T. K.; Cozzitorto, J.; Durkan, B.; Showalter, S. L.; Yeo, C. J.; Brody, J. R. (2008): Expression of indoleamine-2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection. *Journal of the American College of Surgeons*, 206, 849–854.

Witkiewicz, A. K.; Costantino, C. L.; Metz, R.; Muller, A. J.; Prendergast, G. C.; Yeo, C. J.; Brody, J. R. (2009): Genotyping and expression analysis of IDO2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. *Journal of the American College of Surgeons*, 208, 781–789.

Wong, J. L.; Obermajer, N.; Odunsi, K.; Edwards, R. P.; Kalinski, P. (2016): Synergistic COX2 induction by IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  self-limits type-1 immunity in the human tumor microenvironment. *Cancer Immunology Research*, 4, 303–311.

Wrobel, P.; Shojaei, H.; Schitteck, B.; Gieseler, F.; Wollenberg, B.; Kalthoff, H.; Kabelitz, D.; Wesch, D. (2007): Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 320–328.

Yasukawa, M.; Ohminami, H.; Arai, J.; Kasahara, Y.; Ishida, Y.; Fujita, S. (2000): Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans. *Blood*, 95, 2352–2355.

Yu, S.; Li, A.; Liu, Q.; Yuan, X.; Xu, H.; Jiao, D.; Pestell, R. G.; Han, X.; Wu, K. (2017): Recent advances of bispecific antibodies in solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology*, 10, 155.

Zhang, T.; Tan, X.-L.; Xu, Y.; Wang, Z.-Z.; Xiao, C.-H.; Liu, R. (2017): Expression and prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase in pancreatic cancer. *Chinese Medical Journal*, 130, 710–716.

Zhou, F. (2009): Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International Reviews of Immunology*, 28, 239–260.

## 8. Publikationsliste

### Abstracts:

- **Jonescheit H.**, Gonnermann D., Oberg H.-H., Wesch D., Indolamine-2,3-dioxygenase overexpression as a mechanism of interference in  $\gamma\delta$  T-cell mediated lysis of PDAC. 38<sup>th</sup> Symposium of North German Immunologists, Borstel, Oktober 2015
- **Jonescheit H.**, Gonnermann D., Oberg H.-H., Wesch D., Impact of indolamine-2,3-dioxygenase on  $\gamma\delta$  T-cell mediated lysis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). 19<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar, November 2015
- Wesch D., Gonnermann D., **Jonescheit H.**, Kellner C., Peipp M., Sebens S., Kabelitz D., Oberg H.-H., Advantage of  $\gamma\delta$  T cell-based immunotherapy against pancreatic cancer based on their plasticity in bridging innate and adaptive immunity. Annual Retreat Kiel Life Science Verbund, Schleswig, November 2015



## 9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Die eingereichte schriftliche Fassung der Dissertation entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere außerdem, dass ich diese Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

gez. Hannah Jonescheit

Kiel, den 17.04.18

## 10. Danksagung

Für ihre Sorgfalt, Weitsicht und Geduld danke ich meinen beiden Betreuern Frau Prof. Dr. Wesch und Herrn PD Dr. Oberg. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft in Fragen zur technischen und theoretischen Realisation hat wesentlich zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Kabelitz danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Möglichkeit, hier meine Arbeit anfertigen zu können.

Des Weiteren möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe Wesch/Kabelitz und allen Mitarbeitern des Immunologischen Instituts für die Aufnahme in diese „familiäre Gemeinschaft“ danken. Ein besonderer Dank geht hierbei an Daniel und Sandra für die gute Einarbeitung, freundliche Arbeitsatmosphäre, Ratschläge und Diskussionen.

Ich danke meinen Eltern und Michael für das Dach über dem Kopf während des Verfassens dieser Arbeit.