

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. Alexander Scheffold)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss Suppressions-assozierter Zytokine auf das
zytotoxische Potential Phosphoantigen-reaktiver
humaner $\gamma\delta$ T-Zellen**

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

vorgelegt von

Annika Poch, geb. Meyer
aus Berlin

Kiel 2021

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Daniela Wesch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.02.2022

gez.: Prof. Dr. Daniela Wesch

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

„Women will only have true equality, when men share with them the responsibility of bringing up the next generation.“

Ruth Bader Ginsburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vi
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 $\alpha\beta$ T-Zellen	3
1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen	7
1.3.1 $\gamma\delta$ T-Zellen in der Tumorimmuntherapie	9
1.4 Duktales Pankreas Adenokarzinom	11
1.5 Immunsuppressions-assoziierte Zytokine.....	12
1.5.1 Transforming growth factor β (TGF- β)	12
1.5.2 Interleukin 10	14
2 Fragestellung.....	17
3 Material.....	18
3.1 Zellen/Zelllinien	18
3.1.1 $\gamma\delta$ T-Zellen.....	18
3.1.2 Tumorzelllinien.....	18
3.2 Chemikalien und Reagenzien	18
3.3 Medien, Puffer und Lösungen	19
3.4 Testsysteme	20
3.5 Zytokine und Stimuli.....	20
3.6 Antikörper	21
3.6.1 Oberflächenantikörper für die Durchflusszytometrie	21
3.6.2 Intrazelluläre Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	21
3.6.3 Funktionelle Antikörper für die Zellkultur	22
3.6.4 Inhibitoren für die Zellkultur	22
3.7 Verbrauchsmaterialien	22
3.8 Geräte.....	23
3.9 Software.....	24

4	Methoden	25
4.1	Zellbiologische Methoden	25
4.1.1	Zellkultur	25
4.1.1.1	Isolation von PBMZ aus peripherem Blut.....	25
4.1.1.1	Isolation von $\gamma\delta$ T-Zellen mittels magnetischer Separation (MACS)	25
4.1.1.2	Differentielle Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen	26
4.1.1.3	Kultivierung von Tumorzelllinien	28
4.1.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	28
4.1.3	Kryokonservierung von Zellen	28
4.2	Zytotoxizitätsmessung.....	29
4.2.1	Calcein-Freisetzung Analyse	29
4.2.2	RTCA	30
4.3	Durchflusszytometrische Methoden	30
4.3.1	Durchflusszytometrie.....	30
4.3.2	Analyse von Oberflächenproteinen.....	31
4.3.3	Bestimmung der Degranulation	31
4.3.4	Analyse intrazellulärer Proteine	32
4.4	Messung löslicher Faktoren in Überständen	32
4.5	Statistische Analyse	33
5	Ergebnisse	34
5.1	Charakterisierung differentiell stimulierter $\gamma\delta$ T-Zelllinien	34
5.1.1	Einfluss von IL-10 und TGF- β in Kombination mit IL-2 oder IL-15 auf die V δ 2 T-Zell-Proliferation	34
5.1.2	Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächen-Antigenen	36
5.2	Einfluss von IL-10 und TGF- β auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T-Zellen	37
5.2.1	Einfluss des SMAD-Signalwegs auf das zytotoxische Potential von TGF- β - expandierten V δ 2 T-Zellen.....	43
5.3	Bestimmung der Degranulationskapazität von IL-10- bzw. TGF- β - expandierten V δ 2 T-Zellen.....	44

5.4 Einfluss suppressionsassozierter Zytokine auf die Produktion von Effektorproteinen in V δ 2 T-Zellen	46
5.5 Einfluss suppressionsassozierter Zytokine auf die Zytokin- und Chemokinfreisetzung von $\gamma\delta$ T-Zellen	48
5.5.1 Einfluss von IL-6 und IL-9 auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T Zellen.....	50
6 Diskussion	51
6.1 Hemmung der Zellproliferation von V δ 2 T-Zellen durch TGF- β und IL-10.....	51
6.2 Beeinflussung der Differenzierung von V δ 2 T-Zellen durch TGF- β und IL-10.....	52
6.3 Einfluss von IL-10 und TGF- β auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T-Zellen	53
6.4 TGF- β -abhängige Induktion von IL-9 produzierenden CD103 $^{+}$ V δ 2 T-Zellen mit hoher Zytotoxizität.....	58
7 Zusammenfassung	62
8 Literaturverzeichnis.....	63
9 Anhang	82
9.1 Danksagung.....	82
9.2 Publikationsverzeichnis.....	83
9.2.1 Publikationen	83
9.2.2 Konferenzbeiträge.....	83
9.2.2.1 Vorträge	83
9.2.2.2 Poster.....	83

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Knochenmorphogenetisches Protein)
BrHPP	Bromhydrin-Pyrophosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelte immunochemische Analyse)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	<i>Fas Ligand</i>
FKS	Fötales Kälberserum
Ficoll®	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead box protein 3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen-System
HMG-CoA	β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA
IFN-γ	Interferon-γ
i.e.	<i>id est</i> (das heißtt)
IL	Interleukin
Jak1	Januskinase 1
Lamp	Humanes Leukozyten-Antigen-System <i>lysosomal-associated membrane protein</i> (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein)
LRS	Leukozytenrückhaltesystem
MACS	Magnet-aktivierter Zellsorter
mAk	monoklonaler Antikörper

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MAMPs	<i>Microbe-associated molecular patterns</i> (Mikroben-assoziierte molekulare Muster)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I related chain A</i> (MHC-Klasse-I-Polypeptid verwandte Sequenz A)
MICB	<i>MHC class I related chain B</i> (MHC-Klasse-I-Polypeptid verwandte Sequenz B)
mTORC 1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NKG2D	<i>natural killer group 2 member D</i>
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
nBP	Aminiobisphosphonate
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAg	Phosphoantigen
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMZ	peripherale mononukleäre Zellen (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> (Duktales Pankreas Adenokarzinom)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Mustererkennungsrezeptoren)
ROR- γ	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTCA	<i>Real time cell analyzer</i> (Echtzeit Impedanzmessung)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TUZ	Tumorzellen
Tyr2	Tyrosinkinase 2
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor Komplex	4
Abbildung 2: Durchflusszytometrische Untersuchung der Reinheit magnetisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen	26
Abbildung 3: Schematische Darstellung der differentiellen Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen	27
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines „Antikörper-Antigen Sandwich“ bei einem Luminex Assay	33
Abbildung 5: Morphologie und Zellwachstum von in verschiedenen Zytokinmilieus expandierten V δ 2 T-Zellen	35
Abbildung 6: Einfluss der verschiedenen Expansionsbedingungen auf die Expression von CD27 und CD45RA	36
Abbildung 7: Zytotoxische Aktivität differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen gegen verschiedene Tumorzelllinien im xCELLigence (RTCA) System (<i>Echtzeit Impedanzmessung</i>)	38
Abbildung 8: Analyse des zytotoxischen Potentials differentiell expandierter V δ 2 T-Zelllinien mittels xCELLigence (RTCA) System (<i>Echtzeit Impedanzmessung</i>)	41
Abbildung 9: Messung des zytotoxischen Potentials differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen mittels Calcein-Freisetzung Analyse	42
Abbildung 10: Messung der zytotoxischen Aktivität differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen mittels der Calcein-Freisetzung Methode gegen Daudi und Raji Tumorzellen	43
Abbildung 11: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität TGF- β -expandierter V δ 2 T-Zelllinien mittels xCELLigence (RTCA) System (<i>Echtzeit Impedanzmessung</i>) unter Blockade des TGF- β -abhängigen SMAD-Signalweges	44
Abbildung 12: Bestimmung der Degranulation differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen anhand der Oberflächenmobilisierung von CD107a	45
Abbildung 13: Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Mediatoren unter differentiellen Zytokinbedingungen expandierten V δ 2 T-Zellen	47
Abbildung 14: Messung der zytotoxischen Aktivität TGF- β -expandierter V δ 2 T-Zelllinien bei IL-6, IL-6 Rezeptor oder IL-9 Blockade	50

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Um seine zelluläre Integrität zu wahren und sich vor potenziell schädlichen Pathogenen und Substanzen zu schützen, benötigt der menschliche Körper das Immunsystem. Dies ist ein komplexes, aus verschiedenen Zelltypen bestehendes Netzwerk, welches über den gesamten Körper verteilt ist und sich in zwei Hauptkomponenten, das angeborene und das erworbene Immunsystem, unterteilen lässt. Seine Effektorzellen entstehen und reifen in Knochenmark und Thymus, den primären lymphatischen Organen.

Die Komponenten des angeborenen Immunsystems reagieren unmittelbar nach Kontakt zu einem Pathogen mit einer effektiven Immunantwort. Ein Teil des angeborenen Immunsystems wird durch die mechanischen Barrieren von Haut und Schleimhäuten sowie antimikrobiellen Peptiden gebildet. Ein weiterer Teil, das Komplementsystem, besteht aus löslichen Effektormolekülen. Diese reagieren entweder direkt mit Pathogenen oder über an diese gebundene Antikörper und bewirken deren Opsonierung, was wiederum deren Erkennung und Beseitigung durch Phagozytose erleichtert. Des Weiteren führt das Komplementsystem durch die Bildung von Poren in der Zellmembran zur Lyse der Pathogene. Bei der Reaktion des Komplementsystems entstehen außerdem lösliche Komponenten mit einer chemoattraktanten Wirkung, wodurch weitere Zellen des Immunsystems rekrutiert werden. Ein weiterer großer Anteil des angeborenen Immunsystems bildet die zelluläre Abwehr. Hierzu gehören Makrophagen, Granulozyten (insbesondere die Neutrophilen Granulozyten [Neutrophile]) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die meisten Zellen der angeborenen Immunität können über genetisch invariante Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors, PRR*) sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) oder auch Mikroben-assoziierte molekulare Muster (*Microbe-associated molecular patterns, MAMPs*) von Pathogenen erkennen. Dabei handelt es sich um hochkonserve, typische biochemische Strukturen, wie beispielsweise Zellwandbestandteile oder Nukleinsäuren von z.B. Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen. Außerdem können aus dem Zellinneren freigesetzte Moleküle, wie zum Beispiel Adenosintriphosphat (ATP), welche auf eine Zellzerstörung hinweisen

(*Damage-associated molecular pattern, DAMPs*) ebenfalls über PRR entdeckt werden. NK-Zellen können durch Ausschüttung von zytotoxischen Granula den programmierten Zelltod (Apoptose), in beispielweise virus-infizierten oder entarteten Zellen, induzieren. Sie können mit Zielzellen über eine Reihe keimbahnkodierter inhibierende (z. B. *Killer inhibitory receptors [KIR]*, *cluster of differentiation 94 [CD94]*) und aktivierende Rezeptoren (z.B. *Natural Killer Group 2 [NKG2]*, *Natural Cytotoxicity Receptors [NCR]*) auf ihrer Zelloberfläche interagieren. So wird beispielsweise in Abwesenheit von *major histocompatibility complex I* (MHC-I) Molekülen (wie es häufig bei Tumorzellen der Fall ist) kein negatives Signal durch inhibitorische Rezeptoren vermittelt, was direkte zytotoxische Effektorfunktionen der NK-Zellen zur Folge hat. Makrophagen haben ein sehr breites Wirkspektrum. Sie sind neben Neutrophilen, die wichtigsten phagozytierenden Zellen des Körpers und entfernen Krankheitserreger und Zelltrümmer. Zur Beseitigung von Bakterien haben Neutrophile zwei Strategien. Einerseits erfolgt sie über Phagozytose, zum anderen können Neutrophile extrazelluläre Netze (*Neutrophil extracellular traps, NETs*) aus entfalteter DNA bilden und Bakterien damit einfangen und unschädlich machen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems können durch Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen andere Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch Zellen des adaptiven Immunsystems rekrutieren und in ihrer Funktion beeinflussen. Dendritische Zellen und Makrophagen sind in der Lage endo- oder exozytotisch aufgenommene Partikel von Pathogenen über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und fungieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen. Zusammen mit den entsprechenden kostimulatorischen Signalen, können auf diese Weise die Zellen des adaptiven Immunsystems, B- und T-Zellen, aktiviert werden [1, 2].

Das adaptive Immunsystem entwickelt sich von Geburt an stetig weiter, seine Wirksamkeit und Spezifität nimmt im Laufe des Lebens stark zu. Die erworbene Immunantwort setzt mit einer Verzögerung von mehreren Stunden bis Tagen ein und ist durch ihre hohe Spezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert. Sie lässt sich in die humorale, durch B-Lymphozyten (B-Zellen) vermittelte, Immunabwehr und die zellvermittelte Immunabwehr über T-Lymphozyten (T-Zellen) einteilen, wobei beide Komponenten eng miteinander interagieren. Zu Beginn einer Immunantwort steht die Erkennung und Bindung eines Antigens an den B- bzw. T-Zell-Rezeptor (TZR) des Lymphozyten. Um aktiviert zu

werden, benötigen naive T-Zellen noch ein weiteres kostimulatorisches Signal z.B. durch Bindung von CD28 an die Oberflächenpoteine CD80 bzw. CD86 auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ). Nach der antigenspezifischen Aktivierung kommt es zur klonalen Expansion und Differenzierung der Lymphozyten. Eine differenzierte B-Zelle (Plasmazelle) produziert für das erkannte Antigen spezifische Antikörper, welche entweder direkt, zum Beispiel durch Neutralisation eines Toxins, oder über nachfolgenden Mechanismen, wie Komplementaktivierung, die Gefahr unschädlich machen.

T-Zellen können in viele verschiedene Subgruppen differenzieren, dazu gehören beispielsweise zytotoxische T-Zellen (ZTL), regulatorische T-Zellen und T-Helfer-Zellen. Auf die Funktionen von T-Zellen soll im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden. Bei einer Reaktion des adaptiven Immunsystems und der Differenzierung von B- und T-Zellen entstehen außerdem sogenannte Gedächtniszellen, welche bei erneuter Infektion mit dem Mikroorganismus schnell eine spezifische Immunantwort einleiten können [1].

1.2 $\alpha\beta$ T-Zellen

T-Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort ein. Sie besitzen vielfältige Funktionen und werden anhand dieser in eine große Menge verschiedener Subpopulationen eingeteilt. Das wesentliche Merkmal aller T-Zellen ist ihr TZR, der aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt ist. Diese sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die meisten T-Zellen exprimieren einen TZR der aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut ist, während nur ein kleiner Teil einen TZR besitzt, der aus einer γ - und einer δ -Untereinheit besteht. Die Untereinheiten setzen sich wiederum aus mehreren Domänen zusammen - einer variablen, einer konstanten und einer Transmembran-Region (Abb. 1). Die variable Region des Rezeptors bildet eine hochspezifische Bindestelle für das jeweilige Antigen, den Peptid-MHC-Komplex und weist durch somatische Rekombination (auch V-[D]-J-Rekombination) eine enorme Diversität auf [3]. Der TZR selbst besitzt keine Signalfunktion und benötigt zur Signalweiterleitung CD3 -Moleküle. Der TZR liegt als TZR-CD3-Komplex vor, welcher aus den extra- sowie intrazellulären Bestandteilen des TZR und dem CD3-Komplex besteht. Der CD3-Komplex ist aus einer γ - und einer δ -Kette, sowie aus jeweils zwei ε - und ζ -Ketten aufgebaut ist [4].

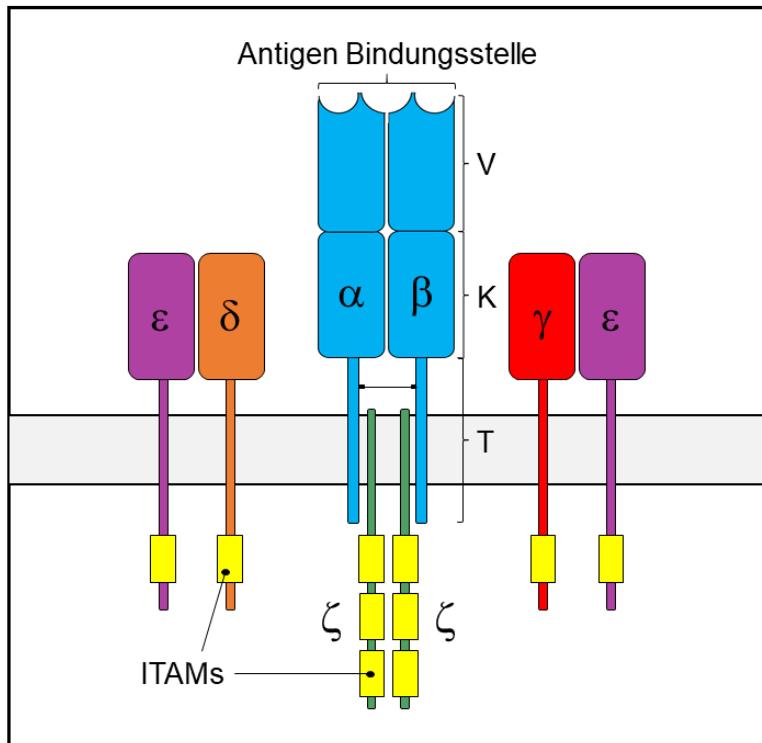


Abbildung 1: Schematische Darstellung des $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor Komplex

Der TZR ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und einer β -Kette. Mit V markiert ist die variable Region der Rezeptoruntereinheiten, an welcher sich die Bindestelle für das MHC-Molekül mit dem präsentierten Peptid befindet (Antigen Bindungsstelle). K kennzeichnet die konstante Region und T die Transmembrandomäne. Die schwarze Linie zwischen den Transmembran-Regionen der α und β Kette stellt die Disulfidbrücken dar, über die das Heterodimer verbunden ist. Der TZR steht in enger Verbindung mit den 6 Signaluntereinheiten des CD3 Komplex. Dieser setzt sich aus zwei ϵ , einer δ und einer γ Kette sowie einem Homodimer aus zwei ζ -Ketten zusammen. Als gelbes Rechteck dargestellt sind *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs), von denen die CD3 α -, β - und γ - Kette eines und die ζ -Kette drei besitzt. Modifiziert nach Murphy et al. [1].

Für die Stimulation des $\alpha\beta$ TZR ist des Weiteren einer der beiden Korezeptoren, CD4 oder CD8, essenziell, welcher spezifisch an die antigenpräsentierenden MHC-Moleküle bindet. CD8 $^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen (ZTL) interagieren mit MHC-Molekülen des Typ I (MHC-I), welche auf allen kernhaltigen Zellen zu finden sind. MHC-I-Moleküle präsentieren zelleigene Antigenfragmente, was u.a. im Falle einer Virusinfektion oder der Entartung von Körperzellen von Bedeutung ist. Durch APZ prozessierte, exogene Antigenfragmente werden über MHC Moleküle des Typs II präsentiert, welcher von CD4 $^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen (T-Helfer-Zellen) gebunden wird [5]. Durch die Bindung des TZR an den MHC-Peptid-Komplex und der Bindung von CD4 oder CD8 an das MHC-Molekül, wird die intrazelluläre Phosphorylierung von sogenannten *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) in den ζ -Ketten und der intrazellulären Domäne von CD3 initiiert.

Durch diese Phosphorylierung kommt es zur Bindung der intrazellulären Tyrosin-Kinase Zap70, die die weitere Signalkaskade der TZR-Aktivierung auslöst [4, 6]. Für die Aktivierung einer naiven T-Zelle ist zusätzlich zu TZR- und CD4- bzw. CD8-Stimulation ein kostimulatorisches Signal nötig. Dieses wird durch Rezeptor-Liganden Interaktionen vermittelt.

Ein wichtiger kostimulatorischer Rezeptor ist hierbei CD28, ein auf allen naiven T-Zellen vorhandenes Oberflächenprotein. CD28 bindet an die auf der Oberfläche von APZ vorhandenen Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), was zu einer Verstärkung TZR Signals und damit zur Proliferation und zur Differenzierung hin zu Effektorzellen führt [7].

Durch kostimulatorische Signalwege können allerdings auch negative Signale integriert werden. So konkurriert beispielsweise der auf T-Zellen vorhandene Rezeptor CTLA-4 (CD152, *cytotoxic T lymphocyte-associated protein*) mit CD28 um die Bindung an dessen Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), wobei CTLA-4 eine höhere Affinität für diese besitzt. Des Weiteren werden nach Bindung der Liganden, Phosphatasen an den intrazellulären Teil von CTLA-4 rekrutiert, wodurch der proximalen TZR-Phosphorylierung und der durch diese induzierten Aktivierung der T-Zelle, entgegen gewirkt wird [8]. Ein weiterer negativ-kostimulatorischer Rezeptor ist *Programmed cell death protein 1* (PD1). Sein Ligand PD1-L kann auf Tumorzellen vorhanden sein. Durch Rezeptor-Liganden Bindung kommt es zur Inhibition von Proliferation, Zytokinproduktion und zytotoxischen Funktionen der T-Zellen [9]. Als Immuncheckpoint Inhibitor werden gegen CTLA-4, PD-1 und PD-L1 gerichtete monoklonale Antikörper (mAb) seit Neuerem in der gezielten Krebstherapie z.B. des malignen Melanoms eingesetzt [10, 11]. Ziel dieser Therapie ist es, die Aktivierbarkeit anerer T-Zellen des Patienten wiederherzustellen und so eine gegen den Tumor gerichtete T-Zellantwort hervorzurufen.

Naive $\alpha\beta$ T-Zellen entwickeln sich nach ihrer Aktivierung in Abhängigkeit des auf der Oberfläche vorhandenen CD4 oder CD8 Moleküls und des umgebenden Zytokinmilieus zu funktionell unterschiedlichen Effektorzellpopulationen [2]. CD4 $^+$ T-Zellen können durch den Einfluss von durch APZ gebildetem Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN)- γ zu T H 1-Zellen differenzieren. Eine solche Differenzierung geschieht u.a. als Immunantwort auf intrazelluläre Erreger. Von T H 1-Zellen typischerweise

produzierte Zytokine sind IFN- γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , wodurch NK-Zellen, Makrophagen und ZTL aktiviert werden können. Charakteristisch für TH1-Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors *T-Box expressed in T cells* (Tbet) [12]. Unter dem Einfluss von IL-4 kommt es bei der Antwort auf Allergene und Helmintheninfektion zur Ausbildung von TH2-Zellen. Diese exprimieren typischerweise den Transkriptionsfaktor *GATA binding protein 3* (GATA-3) [13]. Durch Freisetzung von u.a. IL-4, IL-5, IL-13 aktivieren sie Makrophagen, Mastzellen, Eosinophile sowie Basophile Granulozyten. Eine weitere Population von T-Helferzellen stellen die TH17-Zellen dar, welche eine starke pro-inflammatorische Wirkung haben und bei deren Bildung IL-1 β , IL-6 und IL-23 sowie TGF- β eine Rolle spielen. Sie zeichnen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors *retinoic acid receptor related orphan receptor γt* (ROR γt) aus [14]. TH17-Zellen sezernieren IL-17, IL-21 und IL-22 und fördern so die Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze, welche vor allem durch Neutrophile vermittelt wird [15]. Sie haben außerdem eine Bedeutung im Kontext von Autoimmunerkrankungen [16]. Weitere mögliche Differenzierungswege für CD4 $^+$ TH-Zellen sind TH9- Zellen und follikuläre TH-Zellen [17, 18]. Eine eigene kleine Subpopulation von CD4 $^+$ T-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Hierbei kann zwischen natürlichen, das heißt im Thymus geprägten, regulatorischen T-Zellen (nT_{reg}) und induzierten, also in der Peripherie durch den Einfluss von *transforming growth factor β* (TGF- β) zu T_{reg}-Zellen differenzierten, regulatorischen T-Zellen (iT_{reg}) unterschieden werden [19]. nT_{reg} exprimieren konstitutiv den Transkriptionsfaktor *forkhead box P3* (FoxP3), iT_{reg} verlassen den Thymus ohne FoxP3 zu exprimieren und tun dies erst nach Antigenerkennung in der Peripherie in Kombination mit einem bestimmten Zytokinmilieu. T_{reg} supprimieren angeborene und adaptive Immunantworten und stellen so das Gleichgewicht zwischen Abwehr und Selbstduldanz sicher [20]. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Suppressionsmechanismen bekannt. Ein wichtiger Mechanismus ist beispielsweise die Produktion der regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β sowie die starke Expression der Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 [19, 21, 22]. CD8 $^+$ ZTL können über die Freisetzung von zytolytischen Granula, welche Perforin und Granzyme enthalten, in der Zielzelle die Apoptose initiieren. Perforin bewirkt dabei eine Porenbildung in der Membran der Zielzelle, durch die Granzyme in die Zelle gelangen können, wo sie durch die proteolytische Aktivierung von Caspisen den programmierten Zelltod auslösen. Ein weiterer Effektormechanismus von ZTL, ist die

Oberflächenexpression des Fas-Liganden (CD178), der nach Bindung an den Fas-Rezeptor (CD95) die Apoptose der Zielzelle auslöst [23].

1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen

Im peripheren Blut besitzen ca. 5% aller CD3⁺ T-Zellen einen Antigenrezeptor der aus einem $\gamma\delta$ - anstelle eines $\alpha\beta$ -Heterodimers besteht [24–26]. Intraepithelial in Haut oder Darmschleimhaut (bis zu 20%) können diese Zellen jedoch einen wesentlich höheren Anteil ausmachen [27]. $\gamma\delta$ T-Zellen kommen in allen Vertebraten vor [1]. Sie könnten rechnerisch eine ähnlich große TZR-Rezeptordiversität aufweisen, wie $\alpha\beta$ T-Zellen sie generieren, was *in vivo* allerdings nicht der Fall ist [28]. Anhand der Elemente des TZR lassen sich verschiedene $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen unterscheiden, welche bei Mäusen mit einer bestimmten anatomischen Lokalisation assoziiert sind [29]. Im Menschen existieren 6 exprimierte V δ - (V δ 1-6) und 8 exprimierte V γ -Elemente (V γ 2,3,4,5,8,9) [30, 31]. Am besten beschrieben sind V δ 2 T-Zellen, die den größten Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut ausmachen sowie V δ 1 T-Zellen, welche vor allem in epithelialen Geweben vorkommen [32]. V δ 2 T-Zellen sind oftmals assoziiert mit einem V γ 9-Element, wohingegen V δ 1 T-Zellen mit verschiedenen V γ -Elementen (V γ 2,3,4,5, 8 oder 9) assoziiert sind [31, 33].

$\gamma\delta$ T-Zellen weisen sowohl Charakteristika der angeborenen als auch der erworbenen Immunität auf und werden daher oft als Bindeglied zwischen beiden Bereichen betrachtet [34, 35]. Sie erkennen mit ihrem TZR, im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen, Antigene unabhängig von einer Präsentation durch MHC-Moleküle und weisen daher meist auch keinen CD4 oder CD8 Korezeptor auf [36]. Für V δ 1 T-Zellen wurden bisher verschiedene Klassen von Liganden identifiziert, wie zum Beispiel die stressinduzierbaren Proteine *MHC class I related chain A* (MICA) und *MHC class I related chain B* (MICB). Diese werden außer durch den V δ 1 TZR auch durch *natural killer group 2 member D* -Rezeptoren (NKG2D) erkannt [37, 38]. Des Weiteren wurde auch die Reaktivität von V δ 1 T-Zellen gegen CD1-präsentierte Lipidantigene demonstriert [39–41]. V γ 9 δ 2 T-Zellen, im Weiteren als V δ 2 T-Zellen bezeichnet, können von kleinen phosphorylierten Molekülen, wie Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Hydroxymethylbutenyl-Pyrophosphat (HMB-PP) aktiviert werden [42]. Diese sogenannten Phosphoantigene (pAg) sind in der Regel Zwischenprodukte der

Cholesterin-Biosynthese. Der erste Abschnitt dieses Biosyntheseweges, die Synthese von Isopentenylpyrophosphat, erfolgt bei Eukaryoten über den Mevalonat-Biosyntheseweg, bei Prokaryoten und Parasiten über den Methylerythritolphosphatweg (MEP, im englischen Sprachgebrauch auch als *non-mevalonate pathway* bezeichnet). Dabei entstehen im Falle des MEP körperfremde, mikrobielle Zwischenprodukte, wie beispielweise HMB-PP, welche als Gefahrensignal für Infektionen fungieren und einen wesentlich stärkeren Stimulus für $\gamma\delta$ T-Zellen darstellen als pAg des Mevalonat-Biosyntheseweges. Bei einer Reihe von bakteriellen Infektionen, beispielsweise mit *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, oder *Streptococcus pneumoniae*, konnte eine erhöhte Anzahl von V δ 2 T-Zellen festgestellt werden. Eine vermehrte Anzahl von V δ 2 T-Zellen wurde auch bei Parasiten mit *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* beobachtet [43]. Die physiologische Konzentration endogenen IPPs im menschlichen Körper reicht für eine Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen hingegen nicht aus [44]. Jedoch kann es bei einer Dysregulation des Mevalonat-Biosyntheseweges, wie sie häufig bei bestimmten Tumorerkrankungen auftritt, zu erhöhten IPP-Konzentrationen und zu einer Aktivierung von V δ 2 T-Zellen kommen. Die Akkumulation endogenen IPPs kann pharmakologisch durch Aminobisphosphonate (n-BPs) wie Zoledronat oder Alendronat induziert werden. Therapeutisch werden diese aufgrund ihrer hemmenden Wirkung auf Osteoklasten v.a. zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt. Durch die nBP-induzierte Inhibition der Farnesylypyrophosphat-Synthase (FPPS), die Teil des Mevalonat-Biosyntheseweges ist, kommt es zur Akkumulation von IPP und einer Aktivierung von V δ 2 T-Zellen [45]. V δ 2 T-Zellen können weiterhin durch potente synthetische Analoga von IPP, wie z.B. durch Bromohydrin-Pyrophosphat (BrHPP) aktiviert werden [46]. Neben den bereits erwähnten NK-Rezeptoren wie NKG2D, können $\gamma\delta$ T-Zellen funktionelle PRR, wie z.B. Nod-like receptors (NLR) oder Toll-like receptors (TLR) exprimieren. Dies ermöglicht ihnen direkt auf Pathogene zu reagieren [47–49].

Mithilfe der Oberflächenexpression von CD27 und CD45RA lassen sich $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen in unterschiedliche Differenzierungsstadien einteilen. Hierbei lassen sich naive (T_{naiv} : CD27+CD45RA+), central memory (T_{cm} : CD27+CD45RA-), effector memory (T_{EM} : CD27-CD45RA-) und terminal differenzierte effector memory Zellen (T_{EMRA} : CD27-CD45RA+) unterscheiden. Naive (T_{naiv} , CD27+CD45RA+) und central

memory (T_{cm} , CD27+CD45RA-) Subpopulationen besitzen keine bzw. nur geringe Effektorfunktionen und befinden sich nicht in peripheren Geweben. Sie exprimieren Chemokinrezeptoren für die Migration in sekundäre lymphatische Organe. Effector memory (T_{EM} , CD27-CD45RA-) und terminal differentiated effector memory (T_{EMRA} , CD27-CD45RA+) Subpopulationen hingegen finden sich in entzündeten Geweben oder können dorthin migrieren und Effektorfunktionen ausüben [50]. $\gamma\delta$ T-Zellen können analog zu $\alpha\beta$ T-Zellen in Abhängigkeit vom Antigenstimulus und des vorhandenen Zytokinmilieus zu verschiedenen Effektorzellen differenzieren, die den Phänotypen von $\alpha\beta$ T_{H1} , T_{H2} -, T_{H9} -, T_{H17} - und T_{reg} T-Zellen entsprechen [51–56].

1.3.1 $\gamma\delta$ T-Zellen in der Tumorimmuntherapie

Insbesondere für therapierefraktäre Tumorentitäten mit hoher Mortalität wie beispielsweise das duktale Pankreas Adenokarzinom ist es von großer Bedeutung neue, effektivere Therapieformen als Alternative zu Chemo-, Radiotherapie und chirurgischer Resektion zu entwickeln. Eine Möglichkeit mit einer Vielzahl verschiedener Ansätze stellt die Immuntherapie dar. Hierbei werden Effektormechanismen des Immunsystems gezielt eingesetzt, um Tumorzellen zu zerstören. $\gamma\delta$ T-Zellen eignen sich dafür als Effektorzellen, da sie über eine hohe funktionelle Plastizität mit Eigenschaften des angeborenen und des adaptiven Immunsystems verfügen. Aufgrund ihrer Humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA)-unabhängigen Antigenerkennung und ihre Fähigkeit verschiedene Tumorzellarten zu lysieren, scheinen $\gamma\delta$ T-Zellen besonders geeignet für ein Tumor Immuntherapie mit minimalem Risiko einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion, GvHR) [57]. Die in dieser Arbeit untersuchten V δ 2 T-Zellen werden hierbei über Phosphoantigene (PAg) aktiviert, die von Tumorzellen mit einem dysregulierten Mevalonatweg freigesetzt werden können. *In vitro* und *in vivo* kann für die Aktivierung von V δ 2 T-Zellen Bromohydrin-Pyrophosphat (BrHPP), ein synthetisches PAg, verwendet werden. *In vivo* kann die Freisetzung dieser PAg außerdem über die Hemmung der Farnesylypyrophosphat-Synthase durch Aminobisphosphonate wie Zoledronat oder Palmidronat stimuliert werden. Darüber hinaus können V δ 2 T-Zellen durch Antigenpräsentation und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie IFN- γ und TNF- α andere Immunzellen aktivieren [58]. V δ 2 T-Zellen können leicht aus peripherem Blut isoliert werden, da $\gamma\delta$ T-Zellen etwa

1-5% aller CD3⁺ Zellen innerhalb der PBMZ (periphere mononukleäre Zellen) ausmachen und V δ 2 T-Zellen innerhalb dieses Kompartiments den größten Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen bilden [59]. Somit stellen V δ 2 T-Zellen ein einfache generierbares Werkzeug für Immuntherapien dar. Der Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten korreliert je nach Tumorentität mit zum Teil gegensätzlichen Prognosen. So assoziierte eine Metaanalyse, die 25 verschiedenen Krebserkrankungen einschloss, das Vorkommen von intratumoralen $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer positiven Prognose [60]. Jedoch existieren auch Veröffentlichungen beispielsweise für Brustkrebs und das kolorektale Karzinom, in denen die Infiltration des Tumors mit $\gamma\delta$ T-Zellen als negativer prognostischer Faktor beschrieben wird [61, 62]. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der unterschiedlichen Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen abhängig vom umgebenden Mikromilieu und den darin dominierenden Zytokinen. So können verschiedene Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Zellen unterschiedlichen Einfluss auf das Tumorwachstum haben.

Regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen, deren Differenzierung durch TGF- β induziert wird, können in diesem Zusammenhang beispielsweise über ihre immunsupprimierenden Eigenschaften einen protektiven Effekt auf Tumorzellen haben und somit dessen Wachstum fördern, wohingegen zytotoxische $\gamma\delta$ T-Zellen das Tumorwachstum hemmen [63]. Eine Infiltration von $\gamma\delta$ T-Zellen in malignen Gangepithelien von Patienten mit duktalem Pankreas-Adenokarzinom ist beschrieben [64]. Diese Pankreastumor-infiltrierenden $\gamma\delta$ T-Zellen waren hierbei in engem Kontakt mit regulatorischen T-Zellen und Tumor-assoziierten Makrophagen lokalisiert worden [64, 65].

Bisher wurden zwei verschiedene Ansätze von $\gamma\delta$ T-Zell-basierten Tumortherapien in klinischen Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Entweder wurden V δ 2 T-Zellen *in vivo* durch Gabe von pAg oder n-BPs bei gleichzeitiger Gabe von IL-2 stimuliert oder es erfolgte ein adoptiver Zelltransfer von autologen V δ 2 T-Zellen, welche mit diesen Substanzen *ex vivo* stimuliert und expandiert wurden [66–70]. Bisher konnten mit beiden Strategien jedoch nur moderate Erfolge erzielt werden. Als mögliche Ursachen hierfür kommen z.B. die aktivierungs-induzierte Depletion bzw. Erschöpfung (*Exhaustion*) der $\gamma\delta$ T-Zellen nach wiederholter Stimulation oder die negative Beeinflussung der zytotoxischen Aktivität der Zellen durch die

immunsuppressive Tumorumgebung in Betracht [63, 71] oder intrinsische Tumorescape-Mechanismen [72].

Zur Optimierung dieser Therapien gibt es zum einen Ansätze die zytotoxische Wirkung der Zellen über verschiedene Angriffspunkte, wie zum Beispiel mit Hilfe von Antikörpern zu optimieren [73–75]. Andererseits ist es wichtig, die Bedeutung der Tumormikroumgebung für die Differenzierung und Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen besser zu verstehen [72].

1.4 Duktales Pankreas Adenokarzinom

Das duktale Pankreas Adenokarzinom (PDAC) ist mit einem Anteil von 95% der häufigste Tumor der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) und der dritthäufigste Tumor des Gastrointestinaltraktes. Meist ist es im Pankreaskopf lokalisiert. Jedes Jahr erkranken in Deutschland ca. 17100 Menschen an einem PDAC. Seit Ende der 1990er Jahre lassen sich steigende Tendenzen bei den Erkrankungs- und Sterberaten verzeichnen, wobei die Ursache hierfür bisher nicht vollständig geklärt ist. Als einer der Gründe lässt sich die demographische Entwicklung benennen, da die Erkrankung typischerweise Menschen im höheren Lebensalter betrifft und im Alter zwischen 70-79 Jahren die meisten Erkrankungsfälle auftreten [76]. Das PDAC ist ein äußerst aggressiv wachsender Tumor, so macht er in Deutschland zwar nur die 10. häufigste Krebsentität aus, ist jedoch die 4. häufigste krebsbedingte Todesursache. Die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8% (Männer) bzw. 9% (Frauen) sehr schlecht und hat sich, trotz Fortschritte der PDAC Forschung, in den letzten Jahrzehnten nicht verbessert [76, 77]. Eine Ursache hierfür ist die späte, häufig unspezifische klinische Manifestation, was dazu führt das die Erkrankung in der Regel erst in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird [78]. Ein Biomarker zur Früherkennung konnte bisher nicht identifiziert werden, jedoch spricht die *US Preventive Services Task Force* seit diesem Jahr eine Empfehlung zum Einsatz von bildbasierten Screeningmethoden bei Hochrisikopatienten aus [79]. Als Risikofaktoren spielen erworbene Ursachen wie Rauchen, Adipositas, chronische Pankreatitis oder langjähriger Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle. Es existiert aber auch eine Reihe von genetischen Prädispositionen beispielsweise im Rahmen des Familiären Pankreaskarzinom oder des Peutz-Jeghers-Syndrom, auf welche etwas 20% aller Pankreaskarzinome zurück zu führen sind [76, 79, 80]. Zur hohen Mortalität trägt des

Weiteren das Wachstumsverhalten des Tumors mit früher Metastasierung (v.a. in die Leber) und ausgeprägter lokaler Invasion bei [81]. Darüber weist das PDAC eine hohe Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie auf, sodass für einen kurativen Therapieansatz meist nur eine operative Entfernung des Tumors in Frage kommt. Diese stellt jedoch aufgrund des meist fortgeschrittenen Tumorstadiums nur für 20% der Patienten eine Option dar [80]. Für die strahlen- und chemotherapeutische Resistenz des PDAC wird die umgebende desmoplastische Stromareaktion verantwortlich gemacht, welche bei dieser Tumorentität sehr ausgeprägt ist und die teilweise mehr als die Tumormasse ausmachen kann [82]. Hierbei bilden u.a. Myofibroblasten (auch Pankreassternzellen, *pancreatic stellate cells*, PSC), deren produzierte extrazelluläre Matrix (EZM) sowie Immunzellen der angeborenen wie adaptiven Immunität eine Hülle um den Tumor [83–85]. Zusammen mit den darin gebildeten Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie TGF- β und IL-10 scheint dies ein die Zellproliferation verstärkendes Milieu zu bilden [86–88]. Die Tumormikroumgebung hat einen komplexen Einfluss auf das Wachstum, die Migration und Invasion, die Apoptoseresistenz und Immunevasion von Tumorzellen [89–91]. Es besteht daher großes Interesse das Zusammenspiel zwischen Tumormilieu, Immunsystem und Tumorprogression besser zu verstehen, um dadurch therapeutische Ziele zu identifizieren.

1.5 Immunsuppressions-assoziierte Zytokine

1.5.1 Transforming growth factor β (TGF- β)

TGF- β ist der Prototyp einer Familie von strukturell verwandten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Im Menschen kommt TGF- β in drei Isoformen TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 vor, welche von Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und auch Tumorzellen gebildet werden [92, 93]. Funktionell ist TGF- β ein pleiotropes Zytokin und ist für Zellwachstum, Gewebsdifferenzierung und Wundheilung von Bedeutung. Es fördert die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und ist für einige mesenchymale Zellen ein mitogener Faktor. Dagegen hemmt es das Wachstum von epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen und wirkt bei Immunreaktionen als anti-inflammatorisches Zytokin [94]. Als Rezeptoren fungieren die auf den meisten Zelltypen vorkommenden TGF- β Rezeptoren I und II. Im Menschen

sind 7 verschiedene Typ I Rezeptoren, sogenannte *Activin receptor-like Kinassen* (ALK) 1-7 und 5 unterschiedliche Typ II Rezeptoren bekannt.

Nach proteolytischer Abspaltung eines Propeptids vom TGF- β -Vorläuferprotein mittels Proteasen wie Plasmin oder Matrix-Metalloproteasen liegt die aktive Form von TGF- β vor, welche an den TGF- β Rezeptor II bindet [95, 96]. Dieser bildet daraufhin einen Komplex mit TGF- β Rezeptor I, was die Signaltransduktion initiiert. Der TGF- β Rezeptor I phosphoryliert die intrazellulären Signalmoleküle Smad 2 oder 3, die daraufhin mit Smad 4 Heterodimere bilden und in den Zellkern translozieren, wo sie die Expression verschiedener Zielgene induzieren. Gleichzeitig werden Smad 6 und 7 aktiviert, welche durch die Blockade der Phosphorylierung von Smad 2 und 3 die Signalkaskade hemmen und so eine negative Feedbackschleife bilden. [97]. Die Vielzahl von teilweise gegensätzlichen gewebs- und kontextspezifischen Wirkungen von TGF- β u.a. auf Proliferation, Differenzierung, Migration, Angiogenese und Apoptose wird durch eine hohe Plastizität der TGF- β Signalkaskade ermöglicht, welche zahlreichen Interaktionsmöglichkeiten unterliegt [98, 99]. Als immunsuppressives Zytokin reguliert TGF- β die Bildung und Effektorfunktionen vieler Immunzellen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems [100]. In NK-Zellen kann es beispielsweise die zytotoxische Aktivität und die Produktion von IFN- γ herunterregulieren [101–103]. Dendritische Zellen können durch TGF- β an der Migration in den Lymphknoten und an der dortigen Antigen Präsentation gehindert werden [104]. Den stärksten immunsuppressiven Einfluss übt TGF- β jedoch auf T-Zellen aus und kann deren Differenzierung, Proliferation und Überleben negativ beeinflussen. So wurde gezeigt, dass TGF- β die T-Zell-Proliferation *in vitro* hemmt, wobei diese Inhibition zwar dosisabhängig durch IL-2 abgeschwächt, aber nicht völlig aufgehoben werden kann [105]. Die Wirkung von TGF- β ist abhängig vom Differenzierungsstatus der T-Zellen, vom umgebenden Zytokinmilieu und kostimulatorischen Signalen. Beispielsweise hat TGF- β hemmenden Einfluss auf das Wachstum von naiven T-Zellen. Aktivierte T-Zellen inhibiert das Zytokin jedoch nur wenig, was mit der reduzierten Expression des TGF- β Rezeptors II korreliert [106]. Außerdem hemmt TGF- β die Differenzierung von naiven CD4 $^{+}$ T-Zellen zu TH1- und TH2-Zellen u.a. über die Inhibition dafür wichtiger Transkriptionsfaktoren wie GATA-3 oder T-bet [107, 108]. Ähnlich verhält es sich bei CD8 $^{+}$ T-Zellen, diese werden über die Hemmung der Transkriptionsfaktoren Eomesodermin und T-bet [109] an der

Differenzierung zu ZTL gehindert. Zusätzlich führt die reduzierte T-bet Expression bei T_{H1} -Zellen und CD8 $^{+}$ T-Zellen zu einer Hemmung der IFN- γ Produktion [110, 111]. Des Weiteren senkt TGF- β die zytotoxische Aktivität von CD8 $^{+}$ T-Zellen u.a. durch die Inhibition der Perforin Expression [112]. Andererseits ist TGF- β auch wichtiger Faktor bei vielen T-Zell-Differenzierungsprozessen. In Kombination mit IL-2 induziert TGF- β die FoxP3 Expression in CD4 $^{+}$ Zellen und damit die Differenzierung in CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatorischen T-Zellen [113, 114]. Außerdem ist TGF- β zusammen mit IL-6 oder IL-21 essentiell für die Bildung von proinflammatorischen T_{H17} -Zellen [115, 116]. In der Tumorentstehung hat TGF- β eine duale Rolle: Zum einen durch seine antiproliferative Wirkung als Tumorsuppressor in prämalignen Zellen und zum anderen als Tumorprogressor in malignen Zellen durch Verstärkung der Proliferation, Induktion der Epithelialen-Mesenchymalen Transition und damit der Metastasenbildung sowie der Suppression von Lymphozyten-Effektorfunktionen [117, 118].

1.5.2 Interleukin 10

IL-10 ist ein weiteres wichtiges immunregulatorisches Zytokin und Teil der IL-10 Superfamilie, zu der außerdem IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 und IL-29 gehören [119]. Es wird von verschiedenen Immunzellen wie z.B. T_{H1} -, T_{H2} - und T_{H17} -Zellen, regulatorischen T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen sowie Mastzellen gebildet [120–122]. Darüber hinaus können auch nicht-hämatopoetische Zellen beispielsweise Epithelzellen [123], aber auch Tumorzellen [124, 125] IL-10 zu produzieren.

Stimuli, welche die Expression von IL-10 induzieren sind vielfältig: In dendritischen Zellen und Makrophagen wird sie durch die Erkennung von PAMPs über PRR induziert. Naive CD4 $^{+}$ T-Zellen benötigen einen TZR- sowie einen Ko-Stimulus, wobei die anwesenden Zytokine über die Induktion von JAK-STAT-Signalwegen, den Differenzierungsphänotyp der Zellen bestimmen. Dabei ist in T_{H} -Zellen die Aktivierung des ERK Signalweges für die Expression von IL-10 entscheidend. Für T_{H1} -Zellen sind hierbei hohe Dosen des stimulierenden Antigens, die Anwesenheit von IL-12 und die daraus resultierende Induktion des (*signal transducer and activator of transcription* [STAT]-4) Signalweges von Bedeutung [126]. Die Differenzierung von IL-10 produzierenden T_{H2} -Zellen wird durch IL-4 und die dadurch induzierte STAT6 Signalkaskade vermittelt. In FoxP3 $^{+}$ T_{reg} -Zellen kann TGF- β sowohl die IL-10

Produktion stimulieren als auch die Differenzierung von naive CD4⁺ T-Zellen zu FoxP3⁺ IL-10 produzierenden T_{reg}-Zellen induzieren [127].

Die Signaltransduktion erfolgt nach Bindung von IL-10 an den IL-10 Rezeptor (IL-10R), welcher zur Familie der Klasse II-Zytokinrezeptoren gehört. Er wird aus zwei Untereinheiten IL-10R1 (IL-10R α) und IL-10R2 (IL-10R β) gebildet. IL-10 bindet an IL-10R1, was zur Zusammenlagerung der beiden Untereinheiten und zu einer Konformationsänderung in IL-10R2 führt. Dadurch bindet IL-10 auch an IL-10R2 und es kommt zur Ausbildung eines Rezeptor-Heterotetramers aus je zwei Ketten IL-10R1 und IL-10R2 [128]. Anschließend phosphorylieren die mit den intrazellulären Domänen von IL-10R1 und IL-10R2 assoziierten Tyrosinkinasen Jak1 (Januskinase 1) und Tyk2 (Tyrosinkinase 2) die Tyrosinreste Y446 und Y496 der intrazellulären Domäne des IL-10R1 [129]. Diese bilden eine temporäre Bindungsstelle für STAT3-Monomere, welche von Jak1 phosphoryliert werden und daraufhin STAT3-Homodimere bilden. Danach kommt es zur Translokation der STAT3-Homodimere in den Zellkern, wo sie die Transkription von IL-10 spezifischen Genen initiieren [130].

IL-10 besitzt vielfältige immunregulatorische Funktionen, welche es vor allem durch seine Wirkung auf APZ wie z.B. den Makrophagen vermittelt. So inhibiert es u.a. die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF*), Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF*), Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (*macrophage colony-stimulating factor, M-CSF*), TNF- α und CC-, CXC-Chemokinen in aktivierte Monozyten und Makrophagen [131–136]. Außerdem wirkt IL-10 bei Monozyten und Makrophagen hemmend auf die Oberflächen-Expression von MHC-Klasse II Molekülen, des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (CD54) sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2 [137–139]. Somit beeinträchtigt es die Antigen-Präsentation von Monozyten und Makrophagen und damit die T-Zell-Aktivierung. Wie bereits erwähnt, besitzen auch Tumorzellen die Fähigkeit IL-10 zu bilden, wodurch diese die gegen sie gerichtete Immunantwort supprimieren und das eigene Wachstum fördern können [140, 141]. Die Hemmung der Immunantwort wird hierbei neben der direkten Wirkung auf die Immunzellen u.a. durch die Herunterregulation von MHC-Klasse I und II Molekülen induziert [141]. IL-10 hat zusätzlich zum indirekten Einfluss über die Antigen-Präsentation auch direkte Effekte auf T-Zellen. Zum Beispiel wurde eine

Hemmung der Proliferation sowie eine inhibitorische Wirkung auf die Produktion von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 und TNF- α in CD4 $^{+}$ T-Zellen beschrieben [142, 143], dies geschieht u.a. über die Inhibition des CD28 Signalweges [144]. Es konnten allerdings auch positive Effekte von IL-10 auf Lymphozyten festgestellt werden. Auf CD8 $^{+}$ T-Zellen wurden stimulierende Effekte von IL-10, wie die Steigerung der Proliferation und eine Verstärkung der Zytotoxizität beschrieben [145, 146]. Auch auf B-Zellen kann IL-10 positive Effekte ausüben, beispielsweise wurde eine Steigerung der Proliferation sowie die Förderung der Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen beschrieben. Außerdem wurde eine anti-apoptotische Wirkung über die Verstärkung der Bcl-2 Expression demonstriert [147–149].

2 Fragestellung

Suppressive Zytokine in der Tumormikroumgebung spielen eine wichtige Rolle bei der Immunevasion von Tumoren und bilden die Grundlage für ein schlechtes Ansprechen auf Immuntherapien [150]. In vorangegangenen Arbeiten konnten Peters *et al.* zeigen, dass die Zytokine TGF- β und IL-15 regulatorische Aktivität in $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren [55]. Bei weiterführenden Untersuchungen, von denen diese Dissertation ein Teil ist, wurde festgestellt, dass TGF- β und IL-15 zur Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit einem bemerkenswert hohen zytotoxischen Potential beitragen. Diese Arbeit beschäftigte sich basierend auf dieser Beobachtung genauer mit der Bedeutung der immunregulatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 für das Wachstum und die zytotoxische Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen betrachtet:

1. Welchen Einfluss hat die Zugabe von TGF- β und IL-10 während der Expansion von $\gamma\delta$ T-Zelllinien auf deren Proliferation und Phänotyp?
2. Unterscheidet sich das zytotoxische Potential bzw. die zytotoxische Aktivität der in verschiedenen Zytokinmilieus expandierten $\gamma\delta$ T-Zelllinien?

3 Material

3.1 Zellen/Zelllinien

3.1.1 $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen wurden aus Leukozytenrückhaltesystem-Konzentraten (LRS, auch *buffy coats*) von Vollblutspenden gesunder Spender gewonnen. Die LRS wurden über das Institut für Transfusionsmedizin des UKSH Kiel bezogen. Eine entsprechende schriftliche Einwilligung der Spender wurde dort vor der Spende eingeholt. Die Verwendung der LRS für wissenschaftliche Zwecke wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein genehmigt (D 405/10).

3.1.2 Tumorzelllinien

Zelllinien	Spezifität	Herkunft/Referenz
Daudi	Humanes Burkitt Lymphom	ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>) [151]
Raji	Humanes Burkitt Lymphom	ATCC [152]
Panc1	Humanes duktales Pankreasadenokarzinom	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff [153]
Panc89	Humanes duktales Pankreasadenokarzinom	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff [153]
PancTu-I	Humanes Pankreasadenokarzinom, Primärtumor	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff [153]
Colo357	Lymphknoten-metastase eines humanen adenosquamösen Pankreaskarzinoms	Dr. C. Röder/Prof. Kalthoff [153]

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Aqua destillata	B. Braun Melsungen AG, Melsungen,D
BD Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences, Heidelberg,D
Calcein- AM	Life Technologies, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem, Darmstadt,D
Eosin	Serva, Heidelberg,D
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ficoll®-Hypaque (1,077 g/mL)	Biochrom, Berlin, D
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Karlsruhe, D
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D

MATERIAL

Monensin	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaN ₃	Serva, Heidelberg, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, D
Rinder Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, D
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Life Technologies, Karlsruhe, D
Triton X-100	Merck, Darmstadt, D
Trypsin	Biochrom, Berlin, D
X-VIVO-15	Lonza, Köln, D

3.3 Medien, Puffer und Lösungen

Name	Substanz	Endkonzentration
Einfriermedium	RPMI 1640 FKS DMSO (Dimethylsulfoxid)	20 % (v/v) 10 % (v/v)
Eosinlösung für die Zellzahlbestimmung	Eosin NaN ₃ NaCl-Lösung 0,9 %ig FKS	2 g 0,25 g 450 mL 50 mL
FACS Fixier-Lösung	PFA PBS	1 % (w/v)
FACS staining buffer	PBS FKS NaN ₃	1 % (v/v) 0,1 % (w/v)
FACS Waschpuffer	PBS BSA NaN ₃	1 % (w/v) 0,1 % (w/v)
MACS Waschpuffer	PBS BSA EDTA	0,5 %(v/v) 2 mM
Triton X-100 Lösung	Aqua destilata Triton X-100	10 % (v/v)

MATERIAL

Trypsin/EDTA	PBS Trypsin EDTA	0,05 % (w/v) 0,02 % (w/v)
Zellkulturmedium	RPMI-1640 +/- Phenolrot HEPES L-Glutamin FKS (bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert, dann 0,22 µm steril filtriert) Streptomycin Penicillin	25 mM 2 mM 10 % (v/v) 100 µg/mL 100 U/mL

3.4 Testsysteme

Name	Katalognummer	Firma
Anti-TCRγδ MicroBead Kit	130-050-701	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Cytofix/Cytoperm	554714	BD Biosciences, Heidelberg, D
FcR Blocking Reagent	130-059-901	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
FoxP3 Staining Buffer Set	00-5523	eBioscience, San Diego, USA
Magnetic Luminex Screening Assay	FCSTM18	R&D Systems/BioTechne, Minneapolis, USA

3.5 Zytokine und Stimuli*

Substanz	Konzentration	Endkonzentration	Hersteller
BrHPP	100 µM	300 nM	Innate Pharma, Marseille, F
Ionomycin	5 mg/mL	500 ng/mL	Milipore/Calbiochem, Darmstadt, D
rh IL-2	100000 IU/ml	50 IU/mL	Novartis, Basel, CH
rh IL-10	5 µg/mL	1 ng/mL	R&D Systems, Minneapolis, USA
rh IL-15	10 µg/mL	10 ng/mL	R&D Systems, Minneapolis, USA
TGF-β ₁	1 µg/mL	1,7 ng/mL	R&D Systems, Minneapolis, USA

MATERIAL

TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)	100 µg/mL	10 ng/mL	Sigma Aldrich, Missouri, USA
---	-----------	----------	---------------------------------

*Die eingesetzten Konzentrationen wurden für alle Stimuli und Zytokine in Vorversuchen austriert.

3.6 Antikörper

3.6.1 Oberflächenantikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen bzw. Kontrollanti- körper	Konzentration	Endkonzen- tration/ Verdünnung	Klon	Kon- jugat	Hersteller, (Bestellnummer)
TZR-γδ	25 µg/mL	pur	11F2	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
TZR-γδ	50 µg/mL	17 µg/mL	11F2	Fitc	BD Biosciences, Heidelberg, D
Vδ1	150 µg/mL	30 µg/mL	TS8. 2	Fitc	Thermo Scientific, Langenselbold, D
Vδ2	200 µg/mL	10 µg/mL	B6	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
Vδ2	200 µg/mL	2 µg/mL	B6	PerC P	Biolegend, San Diego, USA
CD27		1:2	M- T271	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D, (#130-113-626)
CD45RA	50 µg/mL	25 µg/mL	L48	PE Cy7	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD107a/ LAMP-1	50 µg/mL	pur	H4A3	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maus IgG ₁	100 µg/mL	entsprechend	X40	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maus IgG ₁	50 µg/mL	entsprechend	X40	Fitc	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maus IgG ₁	200 µg/mL	entsprechend	MOP C-21	PE Cy7	Biolegend, San Diego, USA
Maus IgG ₁	50 µg/mL	entsprechend	X40	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D

3.6.2 Intrazelluläre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen bzw. Kontrollanti- körper	Konzentration	Endkonzen- tration/ Verdünnung	Klon	Kon- jugat	Hersteller (Bestellnummer)
Granzym B	200 µg/mL	2 µg/mL	GB11	AF 647	BD Biosciences, Heidelberg, D

MATERIAL

Perforin	1:40	dG9	AF 647	Biolegend, San Diego, USA, (# 308109)
TNF- α	200 μ g/mL	2 μ g/mL	MAb1 1	BD Biosciences, Heidelberg, D
IFN- γ	200 μ g/mL	2 μ g/mL	4S.B 3	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maus IgG ₁	200 μ g/mL	2 μ g/mL	MOP C-21	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maus IgG _{2B}	1:40		27-35 AF 647	BD Biosciences, Heidelberg, D, (# 558713)

3.6.3 Funktionelle Antikörper für die Zellkultur

Antigen bzw. Kontrollantikörper	Konzentration	Endkonzentration/ Verdünnung
IL-6	100 ng/mL	50 ng/mL
IL-6 Rezeptor	0,824 mg/mL	1 μ g/mL
IL-9 Rezeptor	1 mg/mL	5 μ g/mL
IgG ₁	500 μ g/mL	1 μ g/mL

3.6.4 Inhibitoren für die Zellkultur

Substanz	Konzentration	Endkonzentration	Hersteller
SB 431542 (<i>Activin Receptor-Like kinases</i> (ALK) -4, -5, -7 Inhibitor)	10 mg/mL	0,5 μ M, 5 μ M	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

3.7 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Abdeckplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Einfrierröhrchen (CryoTube™)	Thermo Scientific, Langenselbold, D
Färbeplatten 96er (Spitzboden)	NerbePlus, Winsen/Luhe, D
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Latexhandschuhe	Ansell GmbH, München, D
MACS-LS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten, ungestopft	Assistent, Sondheim, D
Pipettenspitzen (1-10 μ L, 1-200 μ L, 1-1000 μ L)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Reaktionsgefäß (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
RTCA 96er E-Platte	ACEA, San Diego, USA
Schwarze Platten 96er (µCLEAR®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Serologische Pipetten (1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Sterifilter Steritop 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D
Zellkulturflaschen (50 mL, 250 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturplatten (12er, 24er)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturplatten 96er (Rundboden)	Thermo Scientific, Langenselbold, D

3.8 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Absaugvorrichtung	Filter Mate Harvester	Perkin Elmer, Waltham, USA
Bestrahlungsgerät	GammaCell40	Atomic Energie of Canada, Chalk River, Kanada
CO ₂ -Begasungsbrutschränke	Heracell 240	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Durchflusszytometer	LSRFortessa	BD Biosciences, Heidelberg, D
Durchflusszytometer	Luminex LX100 system	LuminexCorporation, Austin, USA
ELISA Reader	Infinite M200	Tecan, Männedorf, CH
Feinwaage	A120S	Sartorius, Göttingen, D
Lichtmikroskop	Axioskop	Zeiss, Jena, D
Lichtmikroskop	Axiovert 10	Zeiss, Jena, D
Magnet-aktivierter Zellsorter	MidiMACS Separator	Miltenyi, Bergisch- Gladbach, D
Pipette	Eppendorf Research 0,1-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, D
Mehrkanalpipette 5-300 µL	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Pipettierhilfen	Accu-jet® pro	Brand, Wertheim, D
Repetierpipette	Nichiryo 8100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Real Time Cell Analyzer	xCELLigence® RTCA SP	ACEA, San Diego, USA
Sterilbank	HeraeusTM LaminAir® HB2472K	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Schwabach, D
Wasserbad	GFL 1083	GFL Labortechnik, Burgwedel

Zählkammer	Neubauer advanced	Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Zentrifuge	5415C	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge	HeraeusTM Varifuge 3.0R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Zentrifuge	HeraeusTM Biofuge 15R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Zentrifuge	HeraeusTM Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D

3.9 Software

Name	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Bioscience, San Jose, USA
Citavi 5.0	Swiss Academic SoftwareGmbH, Wädenswil, CH
FACS Diva 8	BD Bioscience, San Jose, USA
FlowJo™ Software	FlowJo, LLC, Ashland, USA
Graphpad Prism 8	GraphPad Software, LLC, San Diego, USA
i-control™Microplate Reader Software	Tecan, Männedorf, CH
Luminex xPonent 2.3/3.1 firmware	LuminexCorporation, Austin, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
xCELLigence RTCA Software	ACEA Biosciences, San Diego, USA

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultur

4.1.1.1 Isolation von PBMZ aus peripherem Blut

Die Isolation von PBMZ erfolgte aus Leukozytenrückhaltesystem-Konzentraten (LRS) oder Vollblut mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei werden die Bestandteile des Blutes entsprechend ihrer Dichte relativ zur Ficolltrennlösung separiert: Granulozyten und Erythrozyten bilden ein Pellet am Boden des Zentrifugenröhrcchens, Monozyten und Leukozyten sammeln sich an der Phasengrenze zwischen Ficoll-Lösung und PBS / Plasma.

LRS-Konzentrate wurden im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und je 30-35 mL verdünntes Blut über 15 mL Ficoll-Trennlösung (Dichte: 1,077 g/mL) geschichtet. Nach anschließender Zentrifugation (751 g ohne Bremse, 20 min) wurden die als Interphasering akkumulierten Monozyten und Lymphozyten in ein neues Zentrifugenröhrcchen überführt und zur Entfernung von Ficollrückständen und Thrombozyten mehreren Waschschritten mit PBS unterzogen (1. 481 g, 5 min; 2./3. 188 g, 10 min).

Nach anschließender Aufnahme in RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS wurden die Zellen gezählt und ihre Vitalität beurteilt. LRS gesunder Spender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein bereitgestellt. Für die Verwendung von LRS in der Forschung liegt eine schriftliche Einwilligung der Spender vor sowie eine Befürwortung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vor (Codenummer: D405/10).

4.1.1.1 Isolation von $\gamma\delta$ T-Zellen mittels magnetischer Separation (MACS)

Das MACS-Verfahren ermöglicht die Separation definierter Populationen aus einem Zellgemisch. Hierbei werden spezifische mAk, welche sich gegen definierte Oberflächenantigene bestimmter Zellpopulationen richten und an magnetische Mikropartikel (MicroBeads) gekoppelt sind, verwendet. Nach Markierung der gewünschten Zellen mit dem mAk, wird das Zellgemisch über eine Säule mit

paramagnetischer Matrix gegeben. Diese befindet sich in einem Magnetfeld, welches quer zur Fließrichtung der Säule ausgerichtet ist. Somit werden die magnetisch markierten Zellpopulationen in der Säule zurückgehalten.

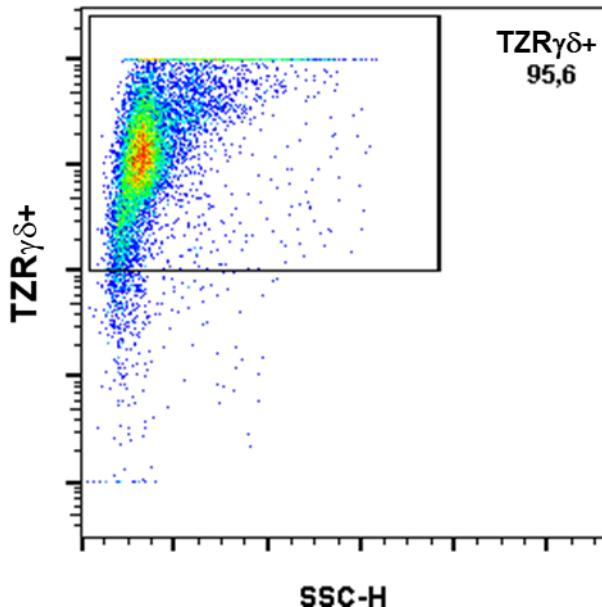


Abbildung 2: Durchflusszytometrische Untersuchung der Reinheit magnetisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen

Aus den PBMZ gesunder Spender wurden $\gamma\delta$ T-Zellen magnetisch isoliert. Nach der Separation erfolgte eine durchflusszytometrische Prüfung der Reinheit der $\gamma\delta$ T-Zellen. Die hierfür verwendete Markierung mit einem TZR $\gamma\delta$ Antikörper erfolgte bereits während der Isolation durch die Verwendung FITC-markierter Micropartikel. Die Abbildung steht exemplarisch für alle magnetischen Separationen in dieser Arbeit ($n=25$ Separationen).

Sind die zurückgehaltenen Zellen die zu isolierende Population, handelt es sich um eine positive Separation. Werden die markierten Zellen aus dem Gemisch entfernt und die effluenten Zellen betrachtet, spricht man von negativer Separation. In dieser Arbeit wurden $\gamma\delta$ T-Zellen ausschließlich positiv separiert, dazu wurde das anti-TZR $\gamma\delta$ *MicroBead Kit* von Miltenyi Biotec verwendet. Durch die Verwendung von zwei MACS-Säulen in zwei aufeinanderfolgenden Separationsschritten wurde eine hohe Reinheit der $\gamma\delta$ T-Zellen erzielt. In dieser Arbeit wurden $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer Reinheit von mindestens 95% verwendet (Abb. 2).

4.1.1.2 Differentielle Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen

Nach der magnetischen Isolation der $\gamma\delta$ T-Zellen wurden diese durch mit 40Gy bestrahlten PBMZ (als Fütterzellen) in Anwesenheit von BrHPP stimuliert und im

Zellkulturbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Durch die BrHPP-Stimulation werden vor allem V δ 2 T-Zellen expandiert, sodass man nach 15 Tagen in Kultur V δ 2 T-Zelllinien erhält. Zusätzlich zur BrHPP-Stimulation wurden die Zellen in Anwesenheit von acht verschiedenen Kombinationen von Zytokinen, deren Einsatzkonzentration vorher austriert wurde, expandiert.

- | | |
|---------------------|----------------------|
| 1. IL-2 | 5. IL-15 |
| 2. IL-2 + IL-10 | 6. IL-15+IL-10 |
| 3. IL-2 + TGF-β | 7. IL-15+TGF-β |
| 4. IL-2+IL-10+TGF-β | 8. IL-15+IL-10+TGF-β |

Alle vier Tage erfolgte eine erneute Zugabe frischer Zytokine sowie an Tag 8 zusätzlich ein Wechsel des Mediums. Beim verwendeten TGF-β handelt es sich immer um TGF-β₁. An Tag 15/16 wurden die Zellen gezählt und ihre zytotoxischen Eigenschaften charakterisiert. Inhibitoren oder Antikörper wurden der Zellkultur an den Zeitpunkten der Zytokin Zugabe zugesetzt (Abb. 3).

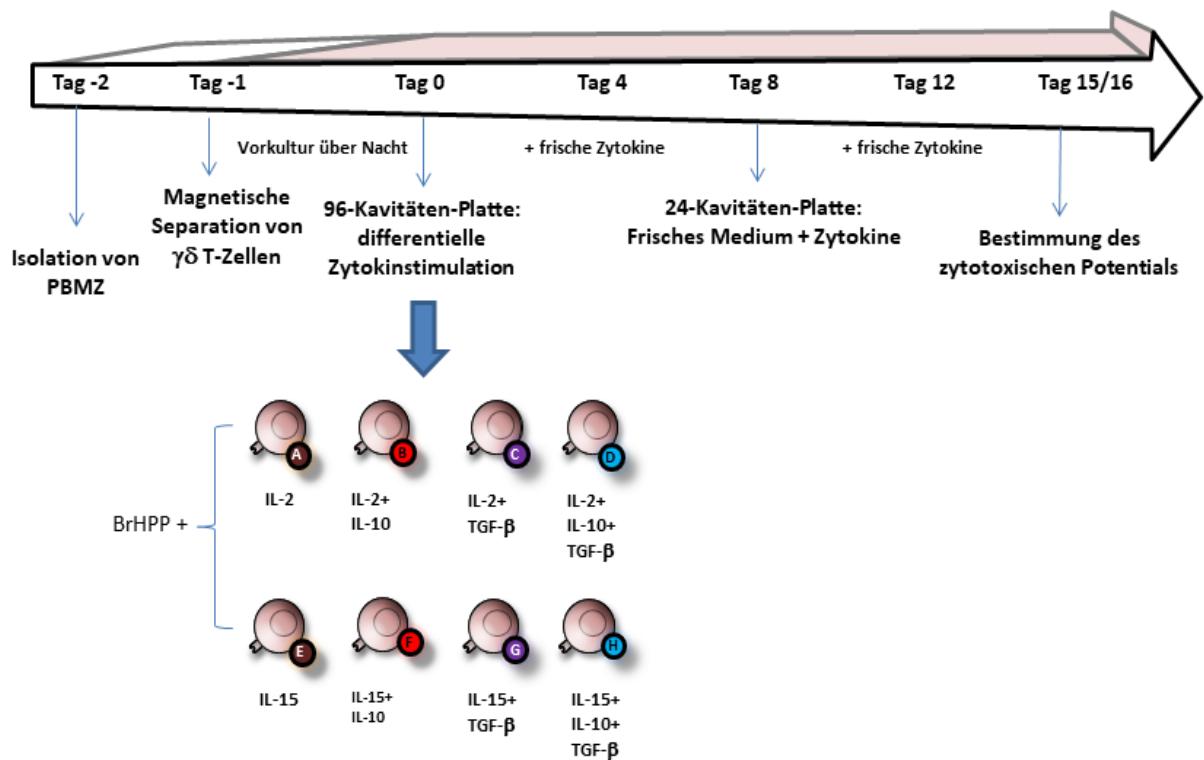


Abbildung 3: Schematische Darstellung der differentiellen Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen

4.1.1.3 Kultivierung von Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden mit RPMI 1640 (+10 % (v/v) FCS, +1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Tumorzellen wurden zu diesen Zeitpunkten passagiert. Bei den adhärent wachsenden Tumorzelllinien wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums durch Inkubation in einer Trypsin/EDTA-PBS-Lösung (0,05 % / 0,02 % (w/v), 10-15 Minuten bei 37 °C) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, abzentrifugiert (317 g, 5 min) und anschließend mit einer definierten Anzahl von Zellen ausgesät. Die Zellzahl wurde für jede Tumorzelllinie so gewählt, dass nach 3 Tagen weitere Zellkultur eine etwa 80%ige Konfluenz zu erwarten war. Die Identität der Tumorzelllinien wurde durch Mikrosatelliten Analyse (*Short Tandem Repeat Analyse*) durch das Institut für Rechtsmedizin des UKSH Kiel überprüft. Die hierfür benötigte DNA wurde zuvor durch die AG Wesch isoliert. Ein möglicher Befall mit Mykoplasmen wurde regelmäßig durch einen Mykoplasmentest ausgeschlossen.

4.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 20 µL der Zellsuspension entnommen, mit 60 µL Eosinlösung verdünnt und anschließend in eine Neubauer Zellkammer überführt. Da tote bzw. beschädigte Zellen eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran aufweisen, kann das Eosin in die Zellen eindringen und sie somit rot färben, wodurch eine Einschätzung der Vitalität möglich wird. Gezählt werden nur vitale Zellen innerhalb von zwei bzw. vier Quadranten der Zählkammer. Die Zellkonzentration errechnet sich daraus wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Summe der ausgezählten Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor (Eosin)} \times \text{Kammerfaktor (}10^4\text{)}$$

4.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die längere Aufbewahrung und mögliche spätere Weiterkultivierung können lebende Zellen in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Um beim Einfrieren die Bildung von Kristallen zu vermeiden, wird dem Einfriermedium DMSO beigefügt. Die

vorher abzentrifugierten Zellen wurden in eisgekühltes Einfriermedium aufgenommen und pro Einfrierröhrchen je 1 mL Zellsuspension mit 20-30x10⁶ Zellen verteilt.

Anschließend lagerten die Einfrierröhrchen zunächst für 30 min bei -20 °C, danach bis zum folgenden Tag bei -80 °C, um in einem letzten Schritt zur endgültigen Lagerung bei -196 °C in flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

Zur Weiterkultivierung der Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstoff entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension mit 10 mL kaltem RPMI1640 Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt, pelletiert (317 g, 5 min) und zur Entfernung des für die Zellen (bei Raumtemperatur) toxischen DMSOs zwei weiteren Waschschriften mit Kulturmedium unterzogen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in RPMI1640 Kulturmedium aufgenommen und im Brutschrank unter den üblichen Bedingungen (37°C, 5 % CO₂) kultiviert.

4.2 Zytotoxizitätsmessung

4.2.1 Calcein-Freisetzung Analyse

Zur Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe der Calcein-Freisetzung Analyse (*Calcein-release assays*) wurden Tumorzellen 30 min bei 37°C in farblosem RPMI-1640 Medium mit Calcein-AM inkubiert. Hierbei wird das Calcein-AM von den Zellen aufgenommen und intrazellulär von endogenen Esterasen zu fluoreszierendem Calcein gespalten, welches bei intakter Zellmembran im Zytosol verbleibt. Nach zwei Waschschriften (317 g, 5 min) wurden die γδ T-Zellen in verschiedenen Effektor/Zielzellverhältnissen (25:1, 12,5:1 und 6,25:1) auf 96-Well V-Boden Platten zu den Tumorzellen gegeben und ein Teil der γδ T-Zellen mit BrHPP restimuliert. Außerdem wurde für die Bestimmung eines Maximallysewertes bzw. eines Wertes für die spontane Zellyse, Triton-X-100 bzw. farbloses RPMI-1640 Medium zu den Tumorzellen gegeben.

Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurden pro Well 100 µL des Überstandes auf schwarze 96-Well Flachboden Platten überführt und die Floureszenzintensität des, von lysierten Tumorzellen freigesetzten, Calceins in den Überständen mit dem ELISA-Reader bestimmt.

4.2.2 RTCA

Mit dem *Real-Time Cell-Analyzer* kann das Wachstum adhärenter Zellen über die Bestimmung des elektrischen Widerstandes (der Impedanz) quantifiziert werden. Die Messung des Widerstandes erfolgt über Goldelektroden am Boden einer speziellen 96-Kavitäten-Flachbodenplatte (E-plate).

Ein Anstieg der Zelldichte beispielsweise durch Zellproliferation, Veränderung der Stärke der Zelladhäsion oder Veränderung der Zellmorphologie führt zu einer Veränderung des Widerstandes, welcher in Form des sogenannten Zell Indexes, der sich zum Widerstand proportional verhält, angegeben wird.

Für die Zytotoxizitätsmessung wurden adhärente Tumorzellen auf der E-plate ausgesät (je nach Tumorzelllinie 5000-6500 Zellen/Kavität) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Anzahl der ausgesäten Tumorzellen wurde hierfür in Vorversuchen so austritiert, so dass der Zellindex nach etwa 24 Stunden Inkubation bei 1 liegt. Nach Erreichen eines Zellindexes ≥ 1 wurden γδ T-Zellen in verschiedenen Effektor/Zielzellverhältnissen (25:1, 12,5:1 und 6,25:1) hinzugegeben, wobei ein Teil der γδ T-Zellen mit BrHPP restimuliert wurde. Da initial die Adhärenz der Tumorzellen in den einzelnen Kavitäten variieren kann und damit auch der Zellindex, erfolgte zu diesem Zeitpunkt zur besseren Vergleichbarkeit eine Normalisierung der Zellindices auf 1.

Durch Zugabe von Triton-X-100 bzw. RPMI-Medium zu den Tumorzellen wurde der Zell Index bestimmt, welcher der maximalen bzw. der spontanen Zellyse entspricht. Die Messung der Zell Indices erfolgte über 72 h alle 3 min mit dem xCelligence RTCA System (ACEA Biosciences). Die Auswertung wurde mit der dazugehörigen RTCA 1.2.1 Software durchgeführt.

4.3 Durchflusszytometrische Methoden

4.3.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene Zelltypen voneinander unterschieden und charakterisiert werden. Dabei binden fluoreszenzmarkierte Antikörper an intrazelluläre oder Oberflächenantigene der Zellen. Die gekoppelten Fluorochrome werden durch Laser im Durchflusszytometer zur Emission von Licht

angeregt. Anhand der unterschiedlichen Emissionsmuster bzw. der Unterschiede von Streulicht kann auf das Vorhandensein der durch die mAk nachgewiesenen Proteine, sowie auf Größe und Granularität der Zellen geschlossen werden.

4.3.2 Analyse von Oberflächenproteinen

Für die durchflusszytometrische (*fluorescence activated cell sorting; FACS*) Analyse von Oberflächenproteinen durch Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern wurden jeweils etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in einer 96-Well V-Boden Platte 4 min bei 239 g und 4°C pelletiert. Danach wurden sie in 200 µL Waschpuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 5 - 10 µL der jeweiligen Antikörperlösung resuspendiert und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte eine Kontrolle mit dem gleichen Isotyp wie der für das Zielantigen verwendete Antikörper (Isotypkontrolle), um auszuschließen, dass dieser gegen Antigene gerichtet war, welche nicht in den untersuchten Zellen auftraten. Nach zwei anschließenden Waschschriften mit je 100 µL Waschpuffer wurde das Zellpellet in 1 % PFA/PBS resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer (FACS Calibur, BD) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo V.10.2.

4.3.3 Bestimmung der Degranulation

Aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen können über sekretorische Granula zytolytische Proteine, wie z.B. Granzyme oder Perforin freisetzen. CD107a (auch Lysosomen assoziiertes Membranprotein, LAMP-1) ist Bestandteil der Membran dieser Vesikel und wird bei deren Freisetzung an die Zelloberfläche gebracht. Daher kann CD107a als Oberflächenmarker zur Quantifizierung der Degranulation verwendet werden. Hierzu wurde der entsprechende mAk für 4 h zu den $\gamma\delta$ T-Zelllinien hinzugegeben. 1 h nach Zugabe des Antikörpers wurde Monensin (3 µM) hinzugegeben, welches den intrazellulären Transport von Zytokinen und Proteinen inhibiert und zu deren Akkumulation am Golgi-Komplex führt, hinzugefügt. Nach weiteren drei Stunden wurde eine Oberflächenfärbung mit einem mAk gegen die V δ 2 Kette des $\gamma\delta$ TZR nach dem Protokoll der Analyse von Oberflächenproteinen (vgl. Abschnitt 3.3.2) durchgeführt

und anschließend zusammen mit der Degranulation am Durchflusszytometer (FACS Calibur, BD) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo V.10.2.

4.3.4 Analyse intrazellulärer Proteine

Zur durchflusszytometrischen Analyse intrazellulärer Proteine wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Diese wurden auf 96er Spitzbodenplatten überführt und in 150 µL Staining Buffer gewaschen (4 min bei 317 g bei 4°C). Danach wurden die Zellen in 100 µL Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) resuspendiert und für 20min im Kühlschrank inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zwei Mal mit jeweils 200 µL Perm/Wash gewaschen (zentrifugiert, 317 g, 4 min). Anschließend wurden die Zellen in 50 µL der Antikörperlösung resuspendiert, für 30 min im Kühlschrank inkubiert und wiederum zwei Mal mit je 200 µL Perm/Wash gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in je 100 µL 1% PFA/PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer (BD LSRII Fortessa) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo V.10.2.

4.4 Messung löslicher Faktoren in Überständen

Von den $\gamma\delta$ T-Zelllinien freigesetzte lösliche Mediatoren wurden aus Überständen mittels der partikelbasierten Multiplex Analyse quantifiziert. Diese Multiplex Analyse ist ein Verfahren, welches erlaubt eine große Anzahl verschiedener Zytokine innerhalb einer Probe gleichzeitig zu messen. Sie kombiniert die Verfahren des *enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA) und der Durchflusszytometrie. Hierbei werden Partikel mit charakteristischer Fluoreszenz eingesetzt, an welche Analyt spezifische Antikörper gekoppelt sind. Nach Bindung der Analyte, wird ein zweiter biotinylierter Antikörper an das Analyt gebunden. Dieser wird für die durchflusszytometrische Quantifizierung wiederum mit Streptavidin-Phycoerythrin (PE) markiert (Abb. 4). Bei der durchflusszytometrischen Messung werden die Partikel-Analyt-Antikörper-PE-Aggregate von zwei Lasern verschiedener Wellenlängen angeregt. Einer erlaubt die Identifizierung des Analyts durch Anregung der charakteristischen Partikelfluoreszenz und der Andere anhand der Stärke des PE-Signals die Quantifizierung des Analyts.

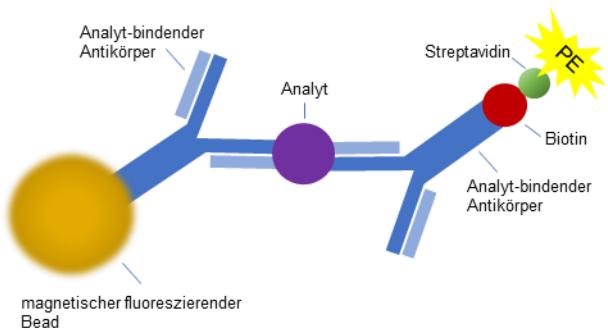


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines „Antikörper-Antigen Sandwich“ bei einem Luminex Assay

Für diese Arbeit wurde ein *Magnetic Luminex Screening Assay* (R&D Systems/Biotechne) verwendet, die Messung erfolgte mit dem Luminex LX100 System (LuminexCorporation, Austin, USA) und mit der dazugehörigen Luminex xPonent 2.3/3.1 firmware Software. Die analysierten Zellkulturüberstände wurden an Tag 4 nach initialer Stimulation entnommen. Danach wurden diese bei -80 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Die Multiplex Analyse wurde nach Hersteller Angaben durchgeführt. Es wurden folgende 15 Analyte untersucht: TNF- α , IFN- γ , IL-1a, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, IL-22, IL-27, CXCL13, LIF, CCL22.

4.5 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) mit GraphPadPrism Software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) oder nicht-parametrischem, zweiseitigem Student's T-Test für ungepaarte Daten mittels Excel (Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, USA) ausgewertet. Eine Überprüfung hinsichtlich der Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test. Zur besseren Vergleichbarkeit einzelner Verteilungen erfolgte eine Standardisierung mittels Z-Normalisierung in Excel.

Statistische signifikante Korrelationen wurden definiert als $p < 0.05$. Signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0.05$) wurden mit einem Stern (*) und Irrtumswahrscheinlichkeiten kleiner 1% ($p < 0.01$) mit zwei Sternen (**) markiert.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung differentiell stimulierter $\gamma\delta$ T-Zelllinien

5.1.1 Einfluss von IL-10 und TGF- β in Kombination mit IL-2 oder IL-15 auf die V δ 2 T-Zell-Proliferation

Der Einfluss der immunregulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β auf die Proliferation von $\alpha\beta$ T-Zellen unterscheidet sich je nach Subpopulation und Differenzierung der Zellen und kann sowohl Wachstums hemmend als auch Wachstums fördernd sein [105, 106, 144–146]. Da bisher wenig über die Wirkung der genannten Zytokine auf das Zellwachstum von $\gamma\delta$ T-Zellen bekannt ist, wurden die Zellzahlen von in verschiedenen Zytokinmilieus expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt. Isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden mit bestrahlten PBMZ und dem synthetischen Phosphoantigen BrHPP stimuliert und danach unter verschiedenen Bedingungen (IL-2 +/- IL-10 +/- TGF- β oder IL-15 +/- IL-10 +/- TGF- β) expandiert. Die Zählung der Zellen erfolgte an Tag 8 und Tag 15 der Zellkultur.

V δ 2 T-Zellen, welche in Anwesenheit von IL-10 und/oder TGF- β expandiert wurden, wiesen nach acht bzw. fünfzehn Tagen eine niedrigere Zellzahl auf als Zellen, die ohne suppressionsassoziierte Zytokine expandiert wurden (Abb. 5A) und dies zeigte sich in den IL-2 expandierten deutlicher als in den IL-15 expandierten.

Bei Kombination von IL-2 und TGF- β wurde die niedrigste, in Kombination mit IL-15 eine deutlich höhere Proliferation beobachtet. Entgegengesetzt verhielt sich dies bei der Kombination von IL-2 und IL-10 bzw. IL-15 und IL-10, bei dieser Konstellation wurde für $\gamma\delta$ [IL-2 + IL-10] T-Zellen höhere Zellzahlen bestimmt. Wurden die Zellen mit IL-10 oder TGF- β allein (ohne IL-15/ IL-2) kultiviert, waren das Wachstum und die Vitalität so gering, dass diese nicht länger als eine Woche kultiviert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

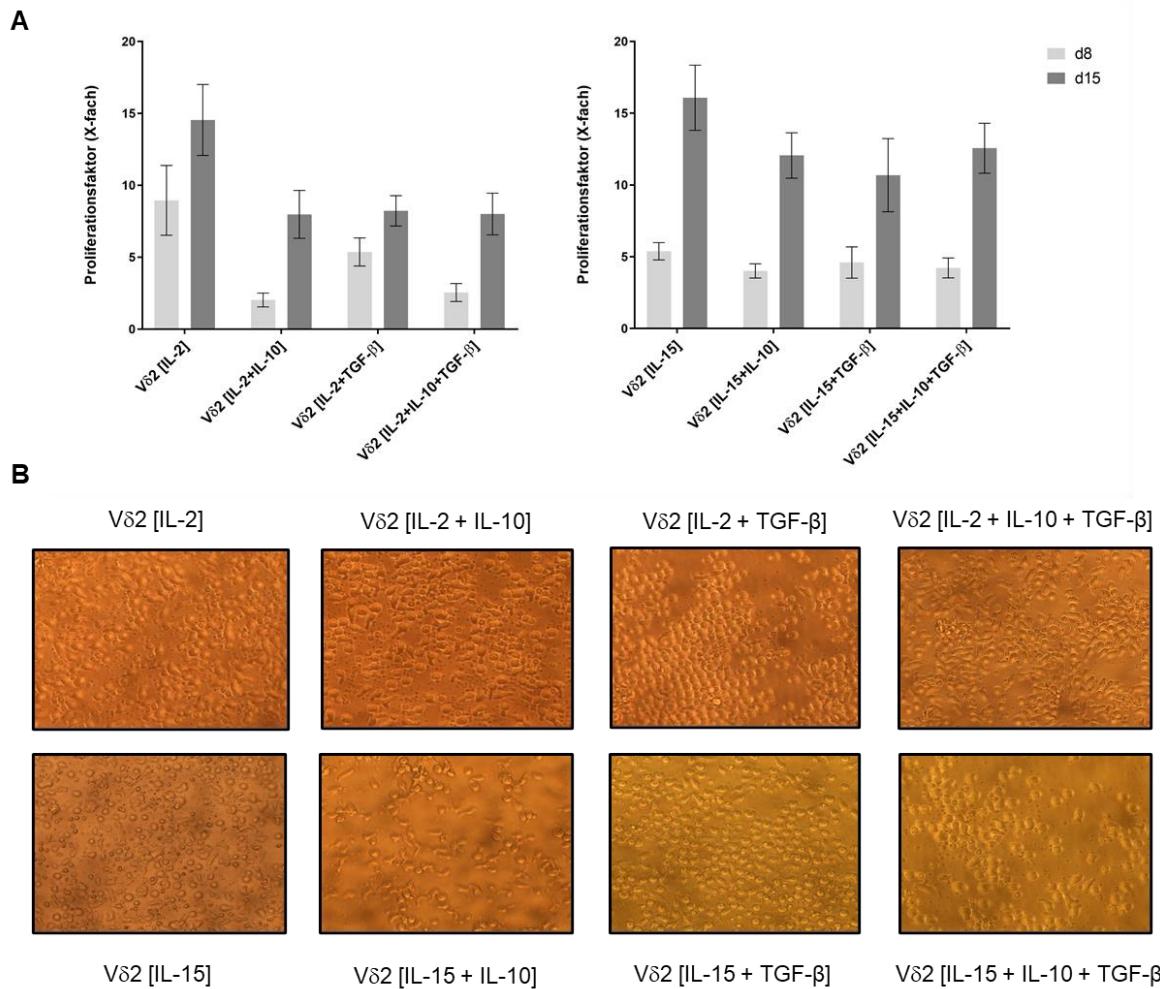


Abbildung 5: Morphologie und Zellwachstum von in verschiedenen Zytokinmilieus expandierten V δ 2 T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen wurden magnetisch isoliert und mit 40×10^3 Zellen/Kavität ausgesät. Die Zellen wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und anschließend in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) expandiert. (A) Die Zellzahl wurde an Tag 8 und 15 der Expansion mit Hilfe einer Neubauer Zählekammer bestimmt und im Verhältnis zur Zellzahl an Tag 0 als Expansionsfaktor (X-fache Änderung der Zellzahl; Tag 0/Tag 8 bzw. Tag 0/Tag 15) dargestellt. (B) Mikroskopische Aufnahme (32x Vergrößerung) der Zellmorphologie der differentiell expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 12. Gezeigt sind der Median des Expansionsfaktors und der Standardfehler aus 18-21 Experimenten.

Abbildung 5B stellt die Morphologie und Verteilung der unter verschiedenen Bedingungen expandierten V δ 2 T-Zellen nach 12 Tagen dar. Die meisten Zellen besaßen eine Runde Zellform, vereinzelt besonders bei V δ 2 [IL-2 + IL-10], V δ 2 [IL-2 + IL-10 + TGF- β], V δ 2 [IL-15 + IL-10] und V δ 2 [IL-15 + IL-10 + TGF- β] zeigten sich eher längliche, spindel- oder birnenförmige Zellen. Unter allen Zytokinbedingungen war (vor allem in der hier nicht abgebildeten 5x Vergrößerung) eine Clusterbildung erkennbar.

5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächen-Antigenen

Anhand der Oberflächenexpression von CD27 und CD45RA können V δ 2 T-Zellen in 4 Subpopulationen eingeteilt werden, die sich funktionell unterscheiden. Die Einteilung erfolgt in *naive* (CD27 $^+$ CD45RA $^+$), *central memory* (T_{cm} , CD27 $^+$ CD45RA $^-$), *effector memory* (T_{EM} , CD27 $^-$ CD45RA $^-$) und *terminal differentiated effector memory* (T_{EMRA} , CD27 $^-$ CD45RA $^+$) V δ 2 T-Zellen [50, 154]. Um zu bestimmen, welche Subpopulationen sich in den verschiedenen Zytokinmilieus entwickeln, wurden CD27 und CD45RA durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 6).

Tag 8

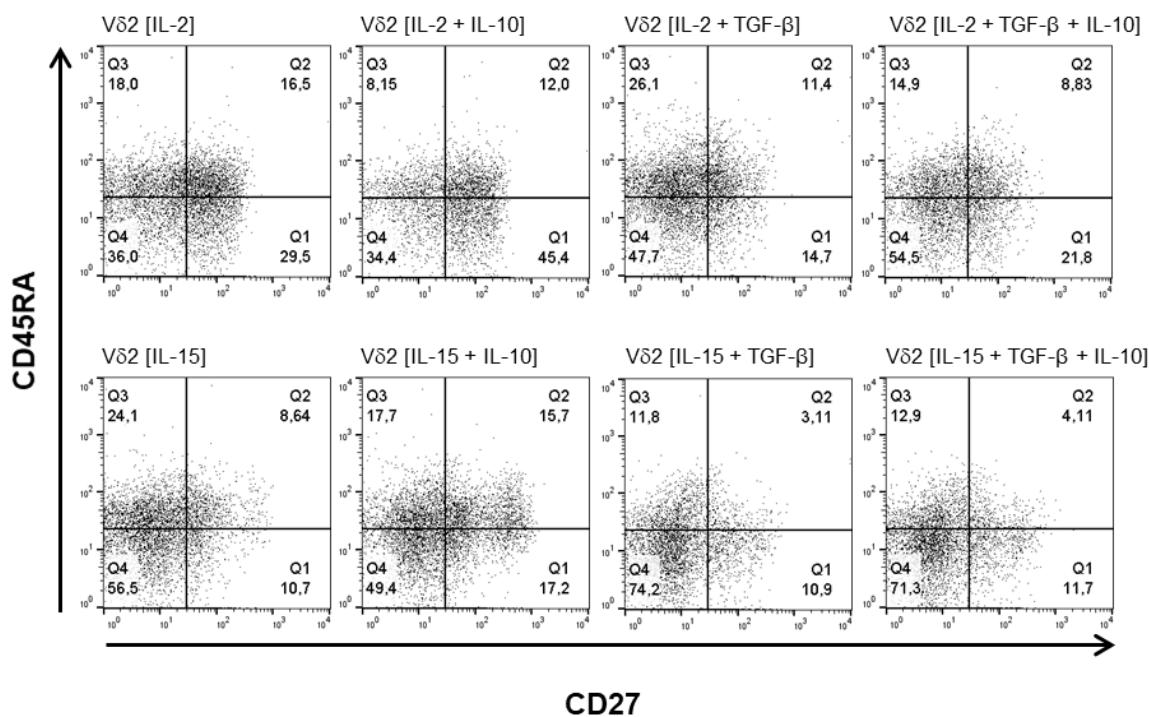


Abbildung 6: Einfluss der verschiedenen Expansionsbedingungen auf die Expression von CD27 und CD45RA

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) für 8 Tage expandiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker CD27 und CD45RA auf den Zellen. Die Zahlen geben die prozentuale Aufteilung der Quadranten an. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender von drei getesteten.

Der Anteil von *naiven* V δ 2 T-Zellen betrug in allen Zytokinmilieus zwischen 8 und 16%, nur bei V δ 2 [IL-15 +TGF- β] und V δ 2 [IL-15 + IL-10 + TGF- β] lag er mit 3-4% niedriger. *Central memory* V δ 2 T-Zellen waren in mit IL-2 kultivierten Zellen mit 15-45% vermehrt

im Vergleich zu mit IL-15 kultivierten Zellen, bei denen der Anteil bei 11-17% lag. Vor allem die V δ 2 Linien [IL-2] und [IL-2 + IL-10] besaßen mit 29,5% und 45,4% die meisten *central memory* V δ 2 T-Zellen. *Effector memory* V δ 2 T-Zellen machten unter allen Zytokinbedingungen den größten Anteil aus. Bei den mit IL-15 expandierten V δ 2 T-Zellen fanden sich verglichen mit IL-2 expandierten V δ 2 T-Zellen mehr dieser Subpopulation (49-74% mit IL-15 zu 34-55% mit IL-2). Außerdem besaßen V δ 2 T-Zellen, welche in Anwesenheit von TGF- β expandiert wurden (unabhängig vom Vorhandensein von IL-10) einen höheren Anteil von *effector memory* Zellen (48-75%) als Zellen ohne TGF- β Zugabe (34-50%). Zwischen 8 und 26% betrug die Menge an *terminal differentiated effector memory* V δ 2 T-Zellen in den 8 verschiedenen Zytokinmilieus, hierbei hatten die V δ 2 [IL-2 + TGF- β] T-Zellen mit 26,1% und V δ 2 [IL-15] T-Zellen mit 24,1% die höchsten Anteile.

5.2 Einfluss von IL-10 und TGF- β auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T-Zellen

Um den Einfluss von IL-10 und TGF- β auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T-Zellen zu untersuchen, wurden die, für 15 Tage in 8 verschiedenen Zytokinmilieus expandierten, V δ 2 T-Zellen mit BrHPP restimuliert oder Zusatz von BrHPP mit PDAC Tumorzelllinien kokultiviert. Die zytotoxische Aktivität wurde durch Echtzeit-Impedanzmessung mit Hilfe des xCELLigence (RTCA) Systems durchgeführt, bei welcher der Abfall des elektrischen Widerstandes der Lyse der adhärenten Tumorzellen entspricht.

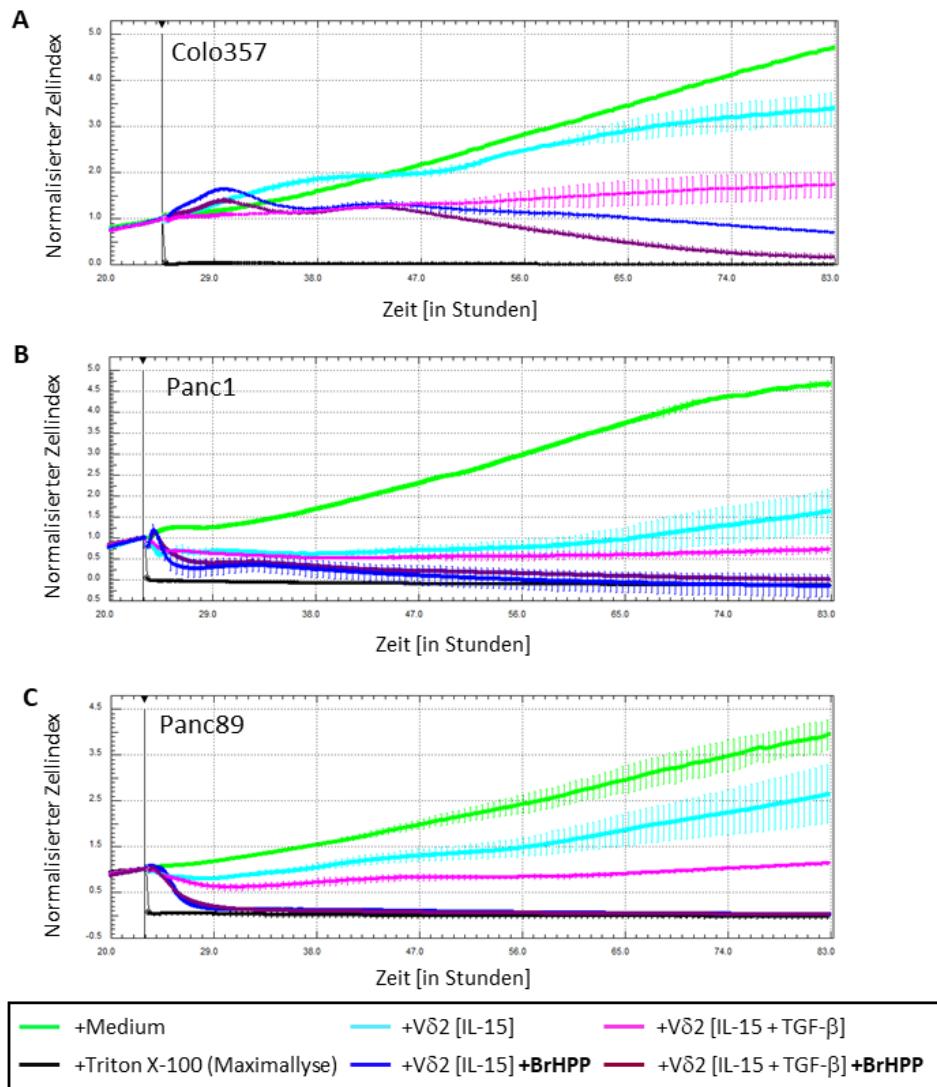


Abbildung 7: Zytotoxische Aktivität differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen gegen verschiedene Tumorzelllinien im xCELLigence (RTCA) System (Echtzeit Impedanzmessung)

Colo357 (A), Panc1 (B) und Panc89 (C) Tumorzellen (5000 – 6500 Zellen/Kavität) wurden auf spezielle 96-Kavitäten-Flachbodenplatten (E-plates) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden in Anwesenheit von IL-2 bzw. IL-15 +/-TGF- β expandierte V δ 2 T-Zellen wurden im Effektor-Zielzellverhältnis 12,5:1 zu den Tumorzellen gegeben, wobei die V δ 2 T-Zellen teils durch Zugabe von BrHPP (300nM) restimuliert (+BrHPP) wurden. Die Änderung der Impedanz ist als Zellindex, normalisiert zum Zeitpunkt der Zugabe der Effektorzellen, dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus Duplikaten eines repräsentativen Spenders von 10 – 15 Spendern. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus Duplikaten dar.

V δ 2 [IL-15 + TGF- β] T-Zellen wiesen im Vergleich zu V δ 2 [IL-15] T-Zellen eine gesteigerte zytotoxische Aktivität gegen Colo357, Panc1 und Panc89 Tumorzellen auf (Abb. 7 A - C). Am deutlichsten war dies in Kokultur mit Colo357- und Panc89-Zielzellen erkennbar. Wurden die V δ 2 T-Zellen zusätzlich durch BrHPP restimuliert, konnte bei allen Zytokinbedingungen eine Steigerung der Zytotoxizität beobachtet werden. Auch hier wiesen die in Anwesenheit von TGF- β expandierten V δ 2 T-Zellen

eine höhere Zytotoxizität als die Kontrollen (i.e. V δ 2 [IL-2] bzw. V δ 2 [IL-15]) auf, wobei der Unterschied zwischen beiden geringer ausfiel.

Eine in Abwesenheit von BrHPP-Restimulation signifikant gesteigerte zytotoxische Aktivität von TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen gegen Panc89 Zellen ließ sich für ein Effektor-Zielzellverhältnis von 25:1 und 12,5:1 über 15 Versuche beobachten. Wenn zusätzlich zu TGF- β auch IL-10 zu der Zellkultur gegeben wurde, kam es zu einem weiteren signifikanten Anstieg der zytotoxischen Aktivität über das Maß der Aktivität von TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen hinaus (Abb. 8 A, C).

Nach BrHPP-Restimulation zeigte sich wiederum die gleiche Tendenz, nur weniger deutlich ausgeprägt. Größere Unterschiede waren bei den mit IL-2 expandierten V δ 2 T-Zellen erkennbar, die insgesamt eine geringere Zytotoxizität aufwiesen. Bei der Kombination von IL-2 bzw. IL-15 mit TGF- β und IL-10 konnte bei BrHPP-Restimulation keine deutliche zusätzliche Steigerung der zytotoxischen Aktivität beobachtet werden (Abb. 8 B, D).

V δ 2 [IL-2 + IL-10] und V δ 2 [IL-15 + IL-10] T-Zellen unterschieden sich in ihrer zytotoxischen Aktivität, unabhängig von BrHPP-Restimulation, kaum von den jeweiligen Kontrollen.

Um die Daten der Echtzeit-Impedanzmessung, die mit Hilfe des xCELLigence Systems ermittelt wurden, mit Hilfe einer weiteren Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität zu überprüfen, wurde diese zusätzlich mit Hilfe der Calcein-Freisetzung-Analyse bestimmt.

ERGEBNISSE

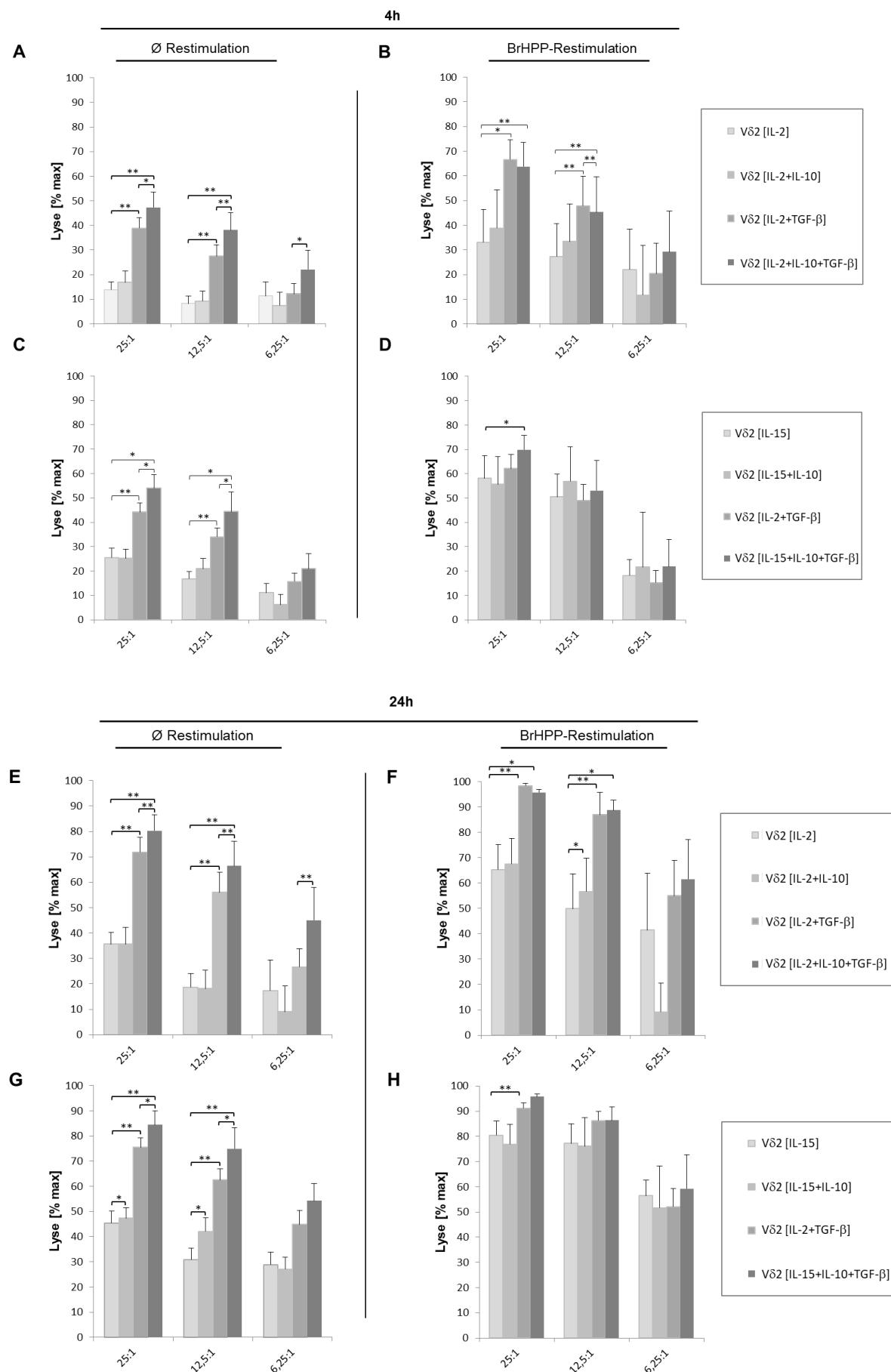


Abbildung 8: Analyse des zytotoxischen Potentials differentiell expandierter V_δ2 T-Zelllinien mittels xCELLigence (RTCA) System (Echtzeit Impedanzmessung)

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF-β (1,7 ng/mL) für 15 Tage expandiert, mit BrHPP (300nM) restimuliert (**A,D,F,H**) oder ohne Restimulation (**B,C,E,G**) in den Effektor-Zielzellverhältnissen 25:1, 12,5:1 und 6,25:1 zu den 24 Stunden zuvor ausplattierten Panc89 Zellen (6500 Zellen/Kavität) gegeben. Die Lyse der Zielzellen wurde 4 (**A,B,C,D**) bzw. 24 Stunden (**E,F,G,H**) nach Zugabe der Effektorzellen gemessen, hier dargestellt als Mittelwert des normalisierten Zellindex aus 10-15 unabhängigen Experimenten. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Sterne entsprechen p-Werten des Student's T-Test (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

Die Ergebnisse beider Methoden unterscheiden sich hierbei nur unwesentlich. Auch über die Calcein Freisetzung konnte beobachtet werden, dass V_δ2 T-Zellen, welche in Anwesenheit von TGF-β (i.e. V_δ2 [IL-2 + TGF-β]; V_δ2 IL-15 + TGF-β]) expandiert wurden, eine gesteigerte zytotoxische Aktivität gegen Panc89 Tumorzellen aufwiesen. Am deutlichsten war dies bei Effektor-Zielzellverhältnissen von 25:1 und 12,5:1 (Abb. 9). Wie bei den Daten, die mit Hilfe des xCELLigence Systems ermittelt wurden, zeigte sich mit Hilfe der Calcein Methode eine erhöhte zytotoxischen Aktivität der TGF-β-expandierten V_δ2 T-Zelllinien (i.e. V_δ2 [IL-2 + TGF-β], V_δ2 [IL-15 + TGF-β]) nach BrHPP-Restimulation (Abb. 9 B). Außerdem wurde für die Kombination aus IL-10, TGF-β und IL-2 bzw. IL-15 ebenfalls keine zusätzliche Steigerung der zytotoxischen Aktivität beobachtet (Abb. 9 B). Die Kombination aus IL-2/IL-15 + IL-10 führte bei den mit der Calcein-Freisetzung Methode ermittelten Ergebnissen eher zu einer, im Vergleich zu den Kontrollen, tendenziell reduzierten Zytotoxizität.

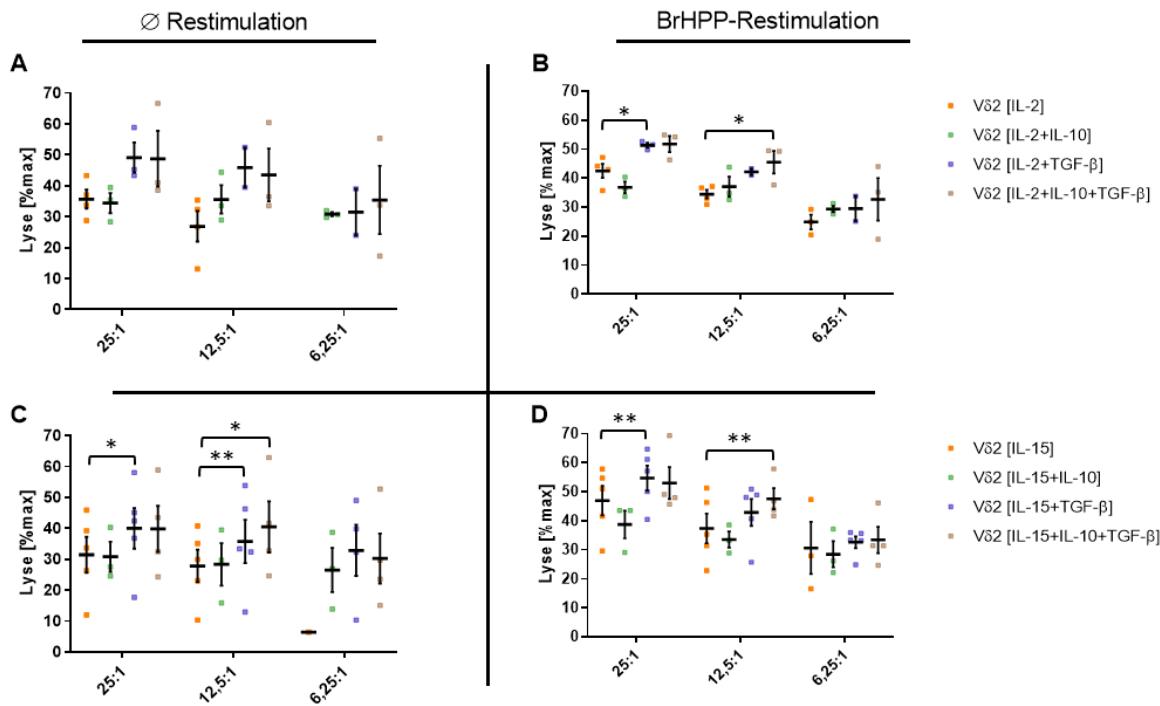


Abbildung 9: Messung des zytotoxischen Potentials differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen mittels Calcein-Freisetzung Analyse

Magnetisch isolierte, initial mit 300 nM BrHPP-stimulierte V δ 2 T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ für 15 Tage in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) expandiert. An Tag 15 erfolgte eine Restimulation mit BrHPP (300 nM) (**B, D**) oder die Zellen wurden direkt (**A, C**) in den Effektor-Zielzellverhältnissen 25:1, 12,5:1 und 6,25:1 zu den zuvor mit Calcein inkubierten Panc89 Tumorzellen gegeben. Die Abnahme der Überstände zur Messung der Calcein Freisetzung erfolgte 4 Stunden nach Zugabe der Effektorzellen zu den Tumorzellen. Die farbigen Symbole repräsentieren die spezifische Lyse als Mittelwert experimenteller Triplikate und unterschiedlicher Spender. Schwarze Balken stellen die Mittelwerte aus 2-5 Experimenten dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA. Sterne entsprechen p-Werten des (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

Da sich diese Methode auch für die Untersuchung der zytotoxischen Aktivität gegen nicht adhärente Zellen eignet, wurde sie für die Messung der zytotoxischen Aktivität gegenüber B-Zell-Lymphomen, den Burkitt Lymphom Zelllinien Daudi- und Raji verwendet. Insgesamt ließen sich auch bei Daudi- und Raji Zellen ähnliche Tendenzen der zytotoxischen Aktivität wie gegen Panc89 Zellen feststellen. So zeigte sich eine relative Steigerung der zytotoxischen Aktivität von TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen (Abb. 10). Allerdings waren die beobachteten Abweichungen zu gering, um signifikante Unterschiede zu liefern.

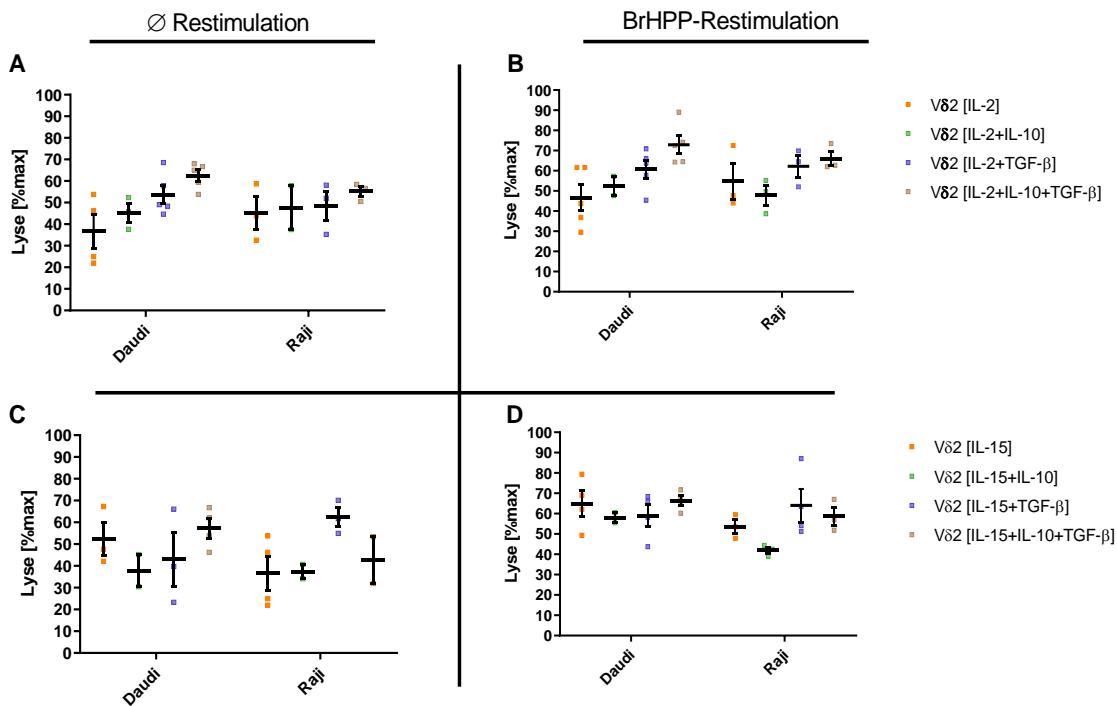


Abbildung 10: Messung der zytotoxischen Aktivität differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen mittels der Calcein-Freisetzungsmethode gegen Daudi und Raji Tumorzellen

Magnetisch isolierte, initial mit 300 nM BrHPP-stimulierte V δ 2 T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ für 15 Tage in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) expandiert und mit BrHPP (300 nM) restimuliert (**B, D**) oder ohne Restimulation (**A, C**) im Effektor-Zielzellverhältnis 12,5:1 den zuvor mit Calcein inkubierten Daudi bzw. Raji Tumorzellen gegeben. Die Abnahme der Überstände zur Messung der Calcein Freisetzung erfolgte 4 Stunden nach Zugabe der Effektorzellen zu den Tumorzellen. Die farbigen Symbole repräsentieren unterschiedliche Spender. Die spezifische Lyse wurde als Mittelwert experimenteller Triplicate ermittelt. Schwarze Balken stellen Mittelwerte aus 2-5 Experimenten dar. Als Zielzellen wurden Daudi und Raji Tumorzellen verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA. Sterne entsprechen p-Werten des (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

5.2.1 Einfluss des SMAD-Signalwegs auf das zytotoxische Potential von TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen

Um festzustellen, ob der SMAD-abhängige Signalweg zur TGF- β -induziert gesteigerten Zytotoxizität beiträgt, wurde der ALK 5 - Inhibitor SB431542 verwendet, mit dessen Hilfe die TGF- β -abhängige SMAD2/3-Phosphorylierung blockiert werden kann.

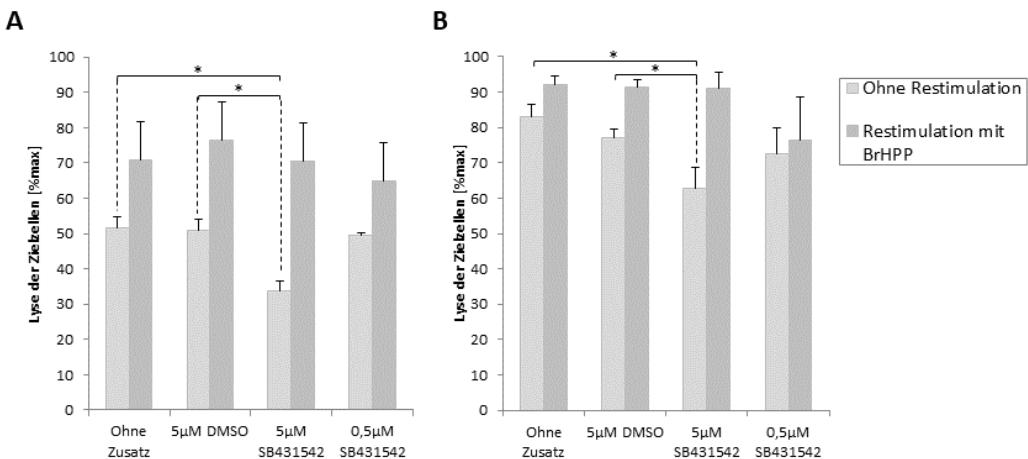


Abbildung 11: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität TGF- β -expandierter V δ 2 T-Zelllinien mittels xCELLigence (RTCA) System (Echtzeit Impedanzmessung) unter Blockade des TGF- β -abhängigen SMAD-Signalweges

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL-15 (10 ng/mL) + TGF- β (1,7 ng/mL) und (wie in Abb. 11 angegeben), unter Zugabe von 5 μ M DMSO (Lösungsmittelkontrolle), 5 μ M SB431542 oder 0,5 μ M SB431542 kultiviert. Die V δ 2 T-Zelllinien wurden teilweise mit 300 nM BrHPP restimuliert und in einem Effektor-Zielzellverhältnis von 25:1 mit 24 Stunden zuvor ausgesäten Panc89 Zielzellen (6500 Zellen/ Kavität) kokultiviert (**A,B**). Die spezifische Lyse nach 4 h (**A**) bzw. 24 Stunden (**B**) ist als Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit drei unterschiedlichen Spendern dargestellt. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Sterne repräsentieren den p-Wert des Studen's T-Test (* $p \leq 0.05$).

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität wurde wiederum die Echtzeit Zellimpedanzmessung (RTCA) eingesetzt. In Gegenwart von 5 μ M SB431542 Inhibitor kultivierte V δ 2 [IL-15 + TGF- β] T-Zellen zeigten ohne Restimulation mit BrHPP eine geringere zytototoxische Aktivität gegen Panc89 Tumorzellen als die Zellen unter Kontrollbedingungen (i.e. V δ 2 [IL-15 + TGF- β] bzw. V δ 2 [IL-15 + TGF- β + DMSO]). Nach BrHPP-Restimulation war die zytotoxische Aktivität insgesamt gesteigert und es waren keine Unterschiede zwischen den SB431542 behandelten V δ 2 T-Zellen und den Zellen unter Kontrollbedingungen mehr erkennbar (Abb. 11 A, B).

5.3 Bestimmung der Degranulationskapazität von IL-10- bzw. TGF- β - expandierten V δ 2 T-Zellen

Um festzustellen, ob die erhöhte zytotoxische Aktivität der mit TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen mit einer erhöhten Degranulation korreliert, wurde die Mobilisierung von CD107a zur Zelloberfläche durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 12).

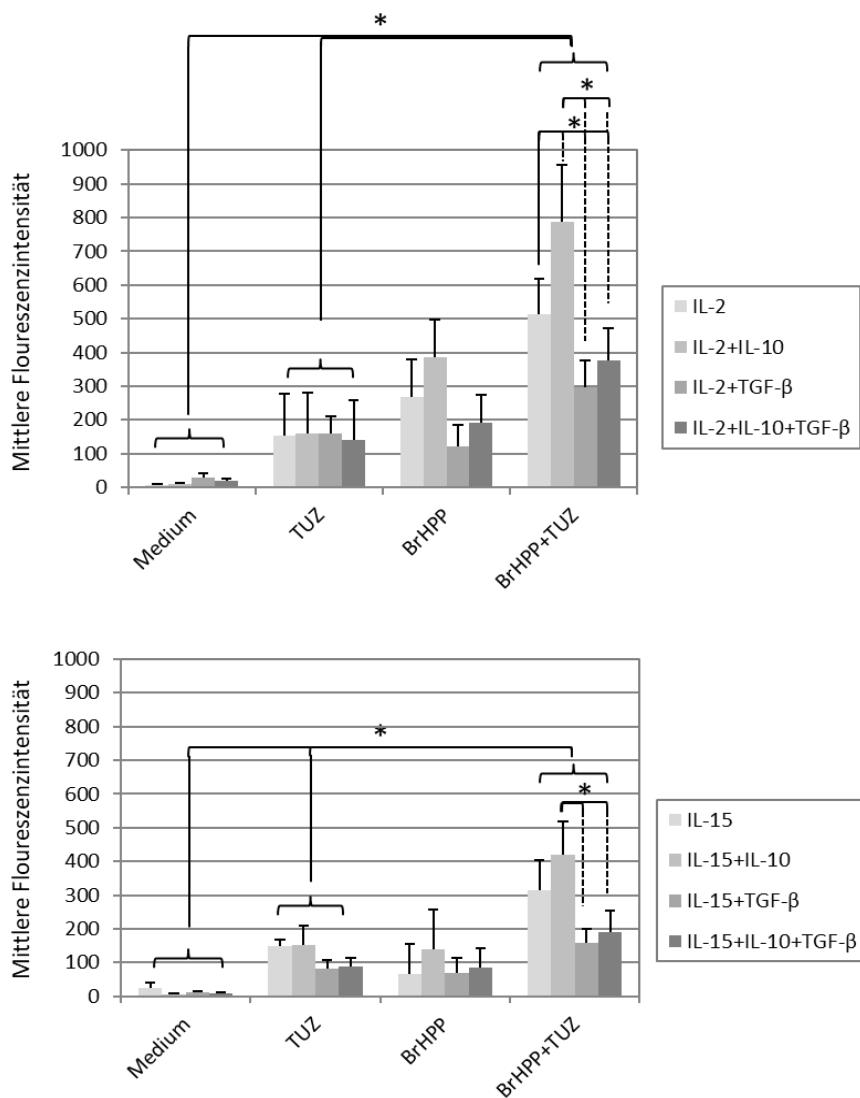


Abbildung 12: Bestimmung der Degranulation differentiell expandierter V δ 2 T-Zellen anhand der Oberflächenmobilisierung von CD107a

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) für 15 Tage expandiert. Anschließend wurde ein Teil der $\gamma\delta$ T-Zellen mit 300 nM BrHPP restimuliert und/oder mit Panc89 (7500 Zellen/Kavität) Tumorzellen (Effektor-Zielzellverhältnis 12,5:1) kokultiviert. Abgebildet ist der Mittelwert der Isotyp-korrigierten mittleren Floureszenzintensität aus 8-12 unabhängigen Experimenten. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Sterne repräsentieren den p-Wert des Student's T-Test (* $p \leq 0.05$).

Bei Kokultur mit Tumorzellen (Effektor-Zielzellverhältnis 12,5:1) oder bei BrHPP-Restimulation kam es bei allen V δ 2 T-Zellen zu einer verstärkten Mobilisierung von CD107a zur Zelloberfläche. Bei BrHPP-Restimulation zeigte sich eine geringere CD107a Oberflächenmobilisierung bei TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen, die sich allerdings nicht signifikant von den anderen Zytokinbedingungen unterschied. Bei

BrHPP-Restimulation in Anwesenheit von Panc89 Tumorzellen kam es zum stärksten Anstieg der CD107a Oberflächenmobilisierung, welche im Vergleich zu unstimulierten Zellen und zur Kokultur mit Panc89 Tumorzellen signifikant höher war. Beim Vergleich der in verschiedenen Zytokinmilieus expandierten V δ 2 T-Zellen zeigte sich wiederum eine schwächere Degranulation der TGF- β -expandierten Zellen (unabhängig davon ob zusätzlich IL-10 während der Expansion vorhanden war) im Vergleich zu den Kontrollen (i.e. V δ 2 [IL-2], V δ 2 [IL-15]). V δ 2 T-Zellen, die zusätzlich zu IL-2 bzw. IL-15 in Anwesenheit von IL-10 expandiert wurden (i.e. V δ 2 [IL-2 + IL-10], V δ 2 [IL-15 + IL-10]) wiesen unter diesen Bedingungen die insgesamt stärkste Oberflächenmobilisierung von CD107a auf, die bei der V δ 2 [IL-2 + IL-10] T-Zellen signifikant erhöht.

Insgesamt wurde eine stärkere Oberflächenmobilisierung von CD107a auf IL-2 expandierten V δ 2 T-Zellen im Vergleich zu mit IL-15 expandierten Zellen beobachtet.

5.4 Einfluss suppressionsassozierter Zytokine auf die Produktion von Effektorproteinen in V δ 2 T-Zellen

Um zu untersuchen, ob TGF- β und IL-10 einen Einfluss auf die Produktion zytotoxischer Mediatoren in V δ 2 T-Zellen haben und darüber möglicherweise die erhöhte Zytotoxizität vermittelt wird, wurden TNF- α , IFN- γ , Granzym B und Perforin intrazellulär durch spezifische Antikörper markiert und durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb.13).

Bei mit IL-2-expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen kam es in Anwesenheit von TGF- β zu einer signifikanten Erhöhung von TNF- α , IFN- γ und Granzym B im Vergleich zur Kontrolle (i.e. V δ 2 [IL-2]). Die Kombination von IL-15 und TGF- β , führte zu einem leichten Anstieg von TNF- α sowie einer signifikanten Zunahme von IFN- γ verglichen mit IL-15 allein. In Gegenwart von IL-10 (i.e. V δ 2 [IL-2 + IL-10] und V δ 2 [IL-15 + IL-10]) bei Expansion der V δ 2 T-Zellen kam es zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Menge von Granzym B im Vergleich zu den Kontrollbedingungen [IL-2/IL-15]. Ein schwach positiver Einfluss auf die Produktion von Perforin konnte bei der V δ 2 [IL-2 + IL-10] T-Zellen beobachtet werden.

ERGEBNISSE

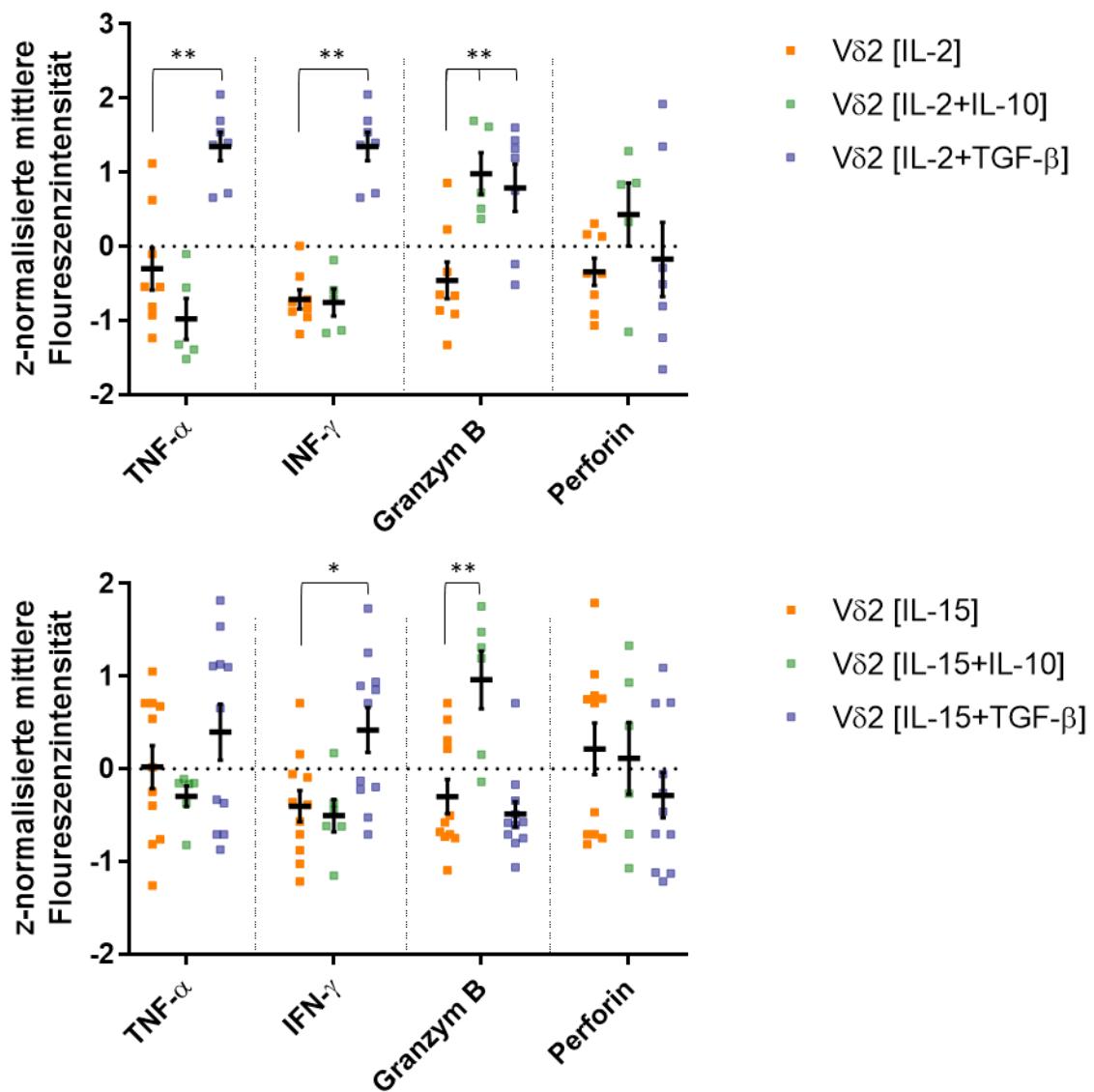


Abbildung 13: Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Mediatoren unter differentiellen Zytokinbedingungen expandierten V δ 2 T-Zellen

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL-2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) für 15 Tage expandiert. Im Anschluss wurden die V δ 2 T-Zellen (5×10^5 Zellen) mit TPA (10 ng/mL) und Ionomycin (500 ng/mL) stimuliert. Nach Fixierung wurden TNF- α , IFN- γ , Granzym B und Perforin durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Die mittlere Floureszenzintensität wurde zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Verteilungen über das jeweilige Experiment Z-normalisiert. Abgebildet als Vierecke (orange, grün, blau) sind Mittelwerte aus 5-11 unabhängigen Experimenten. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Sterne repräsentieren p-Wert des Student's T-Test (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01).

5.5 Einfluss suppressionsassozierter Zytokine auf die Zytokin- und Chemokinfreisetzung von $\gamma\delta$ T-Zellen

Um der Frage nach zu gehen, ob die erhöhte Zytotoxizität der mit TGF- β expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen auf freigesetzte lösliche Mediatoren zurück zu führen ist, wurde deren Konzentration aus den Überständen der $\gamma\delta$ T-Zellkultur mit einem Luminex Assay bestimmt. Hierbei ging es insbesondere um die Betrachtung von Faktoren, welche mit der Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen assoziiert sind. Es wurden TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, IL-22, IL-27, CXCL13, LIF und CCL22 quantifiziert. Für IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17a, IL-22, IL-27 und LIF waren die freigesetzten Mengen sehr niedrig (<100 pg/mL) und keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien feststellbar (Daten nicht gezeigt). V δ 2 [IL-2 + IL-10] und V δ 2 [IL15 + IL10] setzten mehr CCL22, IL-5, IL-13, IFN- γ und TNF- α frei als die jeweilige Kontrolle (V δ 2 [IL-2] bzw. V δ 2 [IL15]) (Abb. 14). Von TGF- β expandierten V δ 2 [IL-2/15 + TGF- β +/- IL-10] wurde im Vergleich zu den Kontrollen mehr CXCL13 freigesetzt. Alle anderen abgebildeten Chemokine wurden von mit TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen weniger freigesetzt.

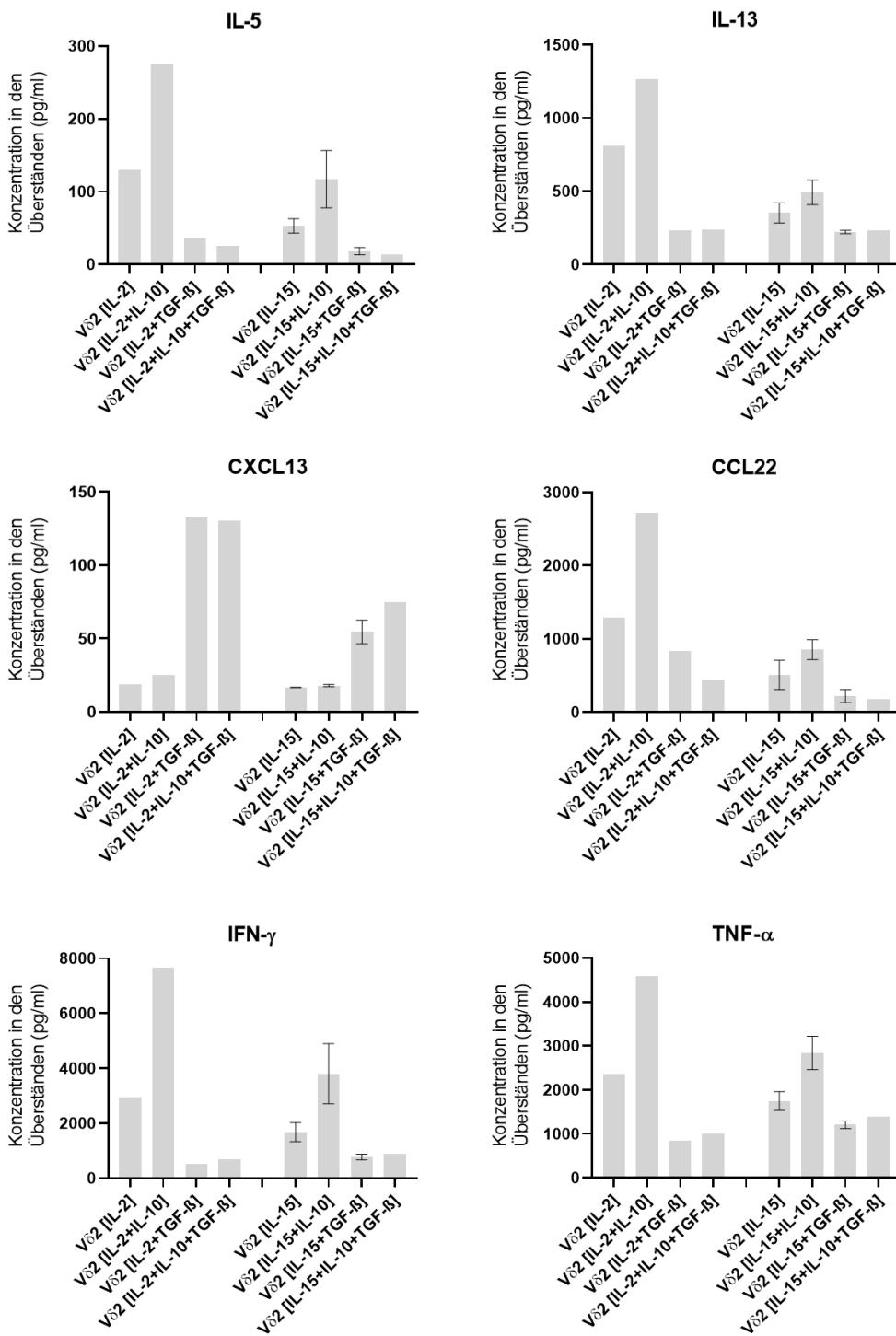


Abbildung 14: Zytokin- und Chemokinfreisetzung von unter verschiedenen Zytokinbedingungen expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL 2 (50 IU) bzw. IL-15 (10 ng/mL) +/- IL-10 (1 ng/mL) +/- TGF- β (1,7 ng/mL) für 15 Tage expandiert. Die Freisetzung von IL-5, IL-13, CXCL13, CCL22, IFN- γ und TNF- α wurde vier Tage nach initialer Stimulation mittels partikelbasierter Multiplexanalyse bestimmt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich für mit IL-15 expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen um Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten von drei verschiedenen Spendern bei in Anwesenheit von IL-2 expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen um Mittelwerte experimenteller Duplikate eines Experiments. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes

5.5.1 Einfluss von IL-6 und IL-9 auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T Zellen

Da in Versuchen der Arbeitsgruppe eine vermehrte Produktion von IL-6 und IL-9 bei mit TGF- β expandierten V δ 2 T-Zellen festgestellt wurde [52], sollte untersucht werden,

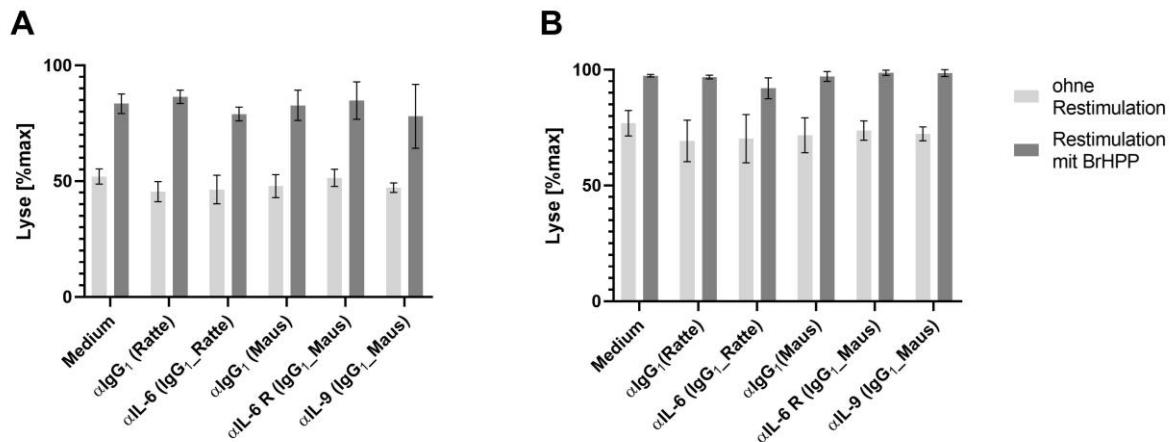


Abbildung 14: Messung der zytotoxischen Aktivität TGF- β -expandierter V δ 2 T-Zelllinien bei IL-6, IL-6 Rezeptor oder IL-9 Blockade

Magnetisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen (40×10^3 Zellen/Kavität) wurden mit 40 Gy bestrahlten PBMZ sowie BrHPP (300nM) stimuliert und in Anwesenheit von IL-15 (10 ng/mL) + TGF- β (1,7 ng/mL) + IL-2low (10 U/mL) (=Medium) und (wie in Abb. 15 angegeben) zusätzlich mit α IL-6, α IL-6 Rezeptor oder α IL-9 sowie den jeweiligen Kontrollen [IgG₁ (Ratte) oder IgG₁ (Maus)] expandiert. Die V δ 2 T-Zelllinien wurden teilweise mit BrHPP restimuliert und in einem Effektor-/Zielzellverhältnis von 25:1 mit 24 Stunden zuvor zur Adhäsion ausgesäten Panc89 (6500 Zellen/Kavität) Zielzellen kokultiviert (A,B). Die mittels xCELLigence (RTCA) System (Echtzeit Impedanzmessung) gemessene spezifische Lyse nach 4 Stunden (A) bzw. 24 Stunden (B) ist als Mittelwert aus 3-6 unabhängigen Experimenten von 3 – 6 verschiedenen Spendern dargestellt. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Sterne repräsentieren den p-Wert des Student's T-Test (*p ≤ 0.05).

ob dies in Zusammenhang mit der erhöhten Zytotoxizität dieser Zellen steht. Dafür wurde die Wirkung beider Zytokine mit Hilfe von Antikörpern gegen IL-6, den IL-6 Rezeptor und IL-9 blockiert. Die Messung des zytotoxischen Potentials erfolgte über eine Echtzeit Zellimpedanzmessung (RTCA). Weder bei Zugabe von α IL-6 oder α IL-6 Rezeptor noch mit α IL-9 war ein Einfluss auf die Zytotoxizität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle festzustellen (Abb. 15).

6 Diskussion

6.1 Hemmung der Zellproliferation von V δ 2 T-Zellen durch TGF- β und IL-10

Aufgrund einer Vielzahl von besonderen Eigenschaften, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur HLA-unabhängigen Antigenerkennung stellen $\gamma\delta$ T-Zellen ein vielversprechendes Werkzeug für eine T-Zell-basierte Immuntherapie von Tumorerkrankungen dar. Ausgehend von der Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass $\gamma\delta$ T-Zelllinien ein besonders hohes zytotoxisches Potential besitzen, wenn sie mit TGF- β und IL-15 expandiert wurden, beschäftigte sich diese Arbeit mit der Untersuchung des Einflusses der in der Tumormikroumgebung vorkommenden Zytokine TGF- β und IL-10 auf die Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen.

Bei der Expansion magnetisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen durch Aktivierung mit dem V γ 9V δ 2 T-Zell-selektiver Stimulus BrHPP in Anwesenheit von IL-2 bzw. IL-15 +/- IL-10 +/- TGF- β konnte festgestellt werden, dass der Expansionsfaktor bei Zellkulturen mit IL-10 und/ oder TGF- β (an Tag 8 und 15) geringer als bei Zellkulturen mit IL-2 oder IL-15 allein war (Abb. 5). Für humane mit *Mycobacterium tuberculosis* stimulierte und in Anwesenheit von TGF- β bzw. IL-10 expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen beschreiben auch andere Arbeiten *in vitro* eine Inhibition der Proliferation, welche durch Zugabe von exogenem IL-2 oder IL-12 überkommen werden konnte [155–157]. Ähnliche Beobachtungen für humane mit BrHPP-stimulierte V γ 9 $\gamma\delta$ T-Zellen beschreiben Capiotto *et al.* bei Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von IL-2 + TGF- β . Hierbei war dieser Effekt durch Zugabe höherer Konzentrationen von BrHPP oder IL-2 reversibel, was diese als Hinweis auf eine mögliche Inhibition der endogenen IL-2 Produktion oder Hemmung von TZR vermittelten Funktionen durch TGF- β werteten [158].

Im Einklang zu den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit zeigten auch vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nach initialer Stimulation (Tag 5 mit BrHPP oder A/E-Partikeln) einen tendenziell negativen Einfluss von TGF- β auf die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen bei Anwesenheit von IL-15 und TGF- β . Hierbei war jedoch zu späteren Zeitpunkten der Expansion und nach Restimulation eine deutlich gesteigerte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen zu beobachten, was auf einen möglichen Einfluss von TGF- β auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Differenzierung zurückgeführt wurde [52]. Zusammenfassend könnte die in dieser Arbeit beobachtete verlangsamte Expansion

in Anwesenheit von TGF- β also auf die Induktion von TGF- β -abhängigen Differenzierungsprozessen gedeutet werden, was möglicherweise auch auf die Expansion mit IL-10 zutreffen könnte.

6.2 Beeinflussung der Differenzierung von V δ 2 T-Zellen durch TGF- β und IL-10

Für TGF- β ist bekannt, dass es zur Differenzierung von T-Zellen beiträgt [108]. Der in dieser Arbeit diesbezüglich untersuchte Oberflächenmarker CD27 wird auf naiven T- und B- sowie NK-Zellen exprimiert und gehört zu den kostimulatorischen Rezeptoren aus der TNF Familie. Während der T-Zell Aktivierung wird dieser hoch und anschließend nach mehrfacher Teilung der Zellen sowie Reifung zu Effektorzellen wieder herab reguliert [159]. Ein Verlust der CD27 Oberflächenexpression ist somit charakteristisch für die Differenzierung von T-Zellen [160]. Für $\gamma\delta$ T-Zellen wird hierzu von einer Abnahme der CD27-Oberflächenexpression bei Expansion mit IL-15 und TGF- β berichtet [52]. Gleches zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. $\gamma\delta$ T-Zellen, welche in Anwesenheit von TGF- β kultiviert wurden, wiesen an Tag 8 der Expansion, einen geringeren Anteil an CD27 $^+$ Zellen auf und besaßen im Vergleich zu in Abwesenheit von TGF- β expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen häufiger einen *effector memory* Phänotyp (CD27 $^-$ CD45RA $^-$) (Abb. 6). Dazu passend zeigte sich auch in den funktionellen Analysen ein erhöhtes zytotoxisches Potential dieser Zellen, worauf in den folgenden Abschnitten noch genauer eingegangen wird. Capietto *et al.* hingegen berichten diesbezüglich von einer Verzögerung der Zellreifung durch TGF- β . Sie stellten fest, dass mit IL-2 und TGF- β kultivierte V γ 9 $\gamma\delta$ T-Zellen im Gegensatz zur Kontrolle (IL-2 allein) an Tag 7 einen beträchtlichen Anteil von naiven Zellen (CD27 $^+$ CD45RA $^+$) aufwiesen [158]. Da Capietto *et al.* für dieses Experiment PBMZ, welche auch $\alpha\beta$ T-Zellen beinhalteten, verwendeten, könnte TGF- β die Entstehung von T_{reg}-Zellen innerhalb der CD4 $^+$ T-Zellen induziert und somit die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen negativ beeinflusst haben. Es ist beschrieben, dass naive periphere CD4 $^+$ CD25 $^-$ T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und TGF- β zu T_{reg}-Zellen mit suppressivem Potential differenzieren können [113, 161], daher kann die verzögerte $\gamma\delta$ T-Zell-Reifung möglicherweise auch auf eine Suppression durch T_{reg}-Zellen zurückzuführen sein.

Wenn zusätzlich zu TGF- β auch IL-10 in der Zellkultur vorhanden war, ähnelte die in dieser Arbeit beobachtete Oberflächenexpression von CD27 und CD45RA den Expansionsbedingungen mit TGF- β allein. Dies war auch in den weiterführenden Untersuchungen zur CD107a-Expression, der Zytokin- und Chemokinfreisetzung und der Zytotoxizität der Fall, sodass die Wirkung von TGF- β auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Differenzierung über den Einfluss von IL-10 zu dominieren scheint.

In Abwesenheit von TGF- β , verfügten die mit IL-2/IL-15 und IL-10 expandierten V δ 2 T-Zellen über den höchsten Anteil T_{CM}-Zellen (CD27 $^+$ CD45RA $^-$) aller 8 verschiedenen Expansionsbedingungen sowie einen großen Anteil an T_{EM}-Zellen (CD27 $^-$ CD45RA $^-$) (Abb. 6). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass IL-10 mit IL-2 *in vitro* bei murinen, anti-CD3/anti-CD28-Antikörper stimulierten CD8 $^+$ T-Zellen einen *central memory* Phänotyp induzieren kann [162]. Dies könnte im Rahmen der Entwicklung von Krebs- und Infektionstherapien für eine Induktion von Gedächtniszellen eine Rolle spielen.

6.3 Einfluss von IL-10 und TGF- β auf das zytotoxische Potential von V δ 2 T-Zellen

Bei Untersuchung der zytotoxischen Aktivität der differenziell expandierten V δ 2 T-Zellen gegenüber duktalen Pankreaskarzinomlinien mittels Echtzeit Impedanzmessung (RTCA) und Calcein-Freisetzung Analyse und der dafür maßgeblichen Effektormechanismen wiesen mit IL-10 (und IL-2 bzw. IL-15) expandierte V δ 2 T-Zellen eine ähnliche, zum Teil sogar signifikant höhere zytotoxische Aktivität auf als mit IL-2 oder IL-15 allein kultivierte Zellen (Abb. 8,9). Ein solcher Einfluss von IL-10 auf $\gamma\delta$ T-Zellen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Interessanterweise wurde bei humanen und murinen NK-Zellen eine Steigerung der Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* unter dem Einfluss von IL-10 berichtet und auch für humane und murine CD8 $^+$ T-Zellen gibt es Arbeiten, die zeigen, dass IL-10 in Kombination mit IL-2 *in vitro* deren zytotoxisches Potential erhöhen kann [146, 163–170]. Die genauen Mechanismen dahinter sind teilweise noch nicht abschließend untersucht, jedoch wurde beispielweise für murine tumorresidente CD8 $^+$ T-Zellen eine direkte Aktivierung der Zellen durch IL-10 *via* Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 beobachtet. Als ein anderer Mechanismus wurde außerdem die IL-10 vermittelte Induktion von IFN- γ in

humanen CD8⁺ T-Zellen sowie murinen tumorresidenten CD8⁺ T-Zellen festgestellt [166, 170, 171].

Im Kontext der Differenzierung von humanen iT_{reg}-Zellen wird IL-10 als Verstärker des suppressiven Potentials beschrieben [172].

Allgemein gilt IL-10 als pleiotropes Zytokin, dessen Rolle im tumorimmunologischen Kontext kontrovers diskutiert wird [173]. So wurden unterschiedliche gegensätzliche Effekte von IL-10 beobachtet, welche einerseits das Tumorwachstum fördern können, wie beispielsweise die Suppression proinflammatorischer Zytokine oder die Hemmung der HLA-abhängigen zellvermittelten Immunantwort, welche u.a. über die Herabregulierung der MHC II Expression auf APZ sowie die Inhibition des kostimulatorischen CD28 Signalweges erfolgen kann [144]. Andererseits können IL-10 vermittelte Effekte, wie die Stimulation von zytotoxischen Immunzellen oder die Inhibition angiogenetischer Faktoren auch eine Tumorregression bewirken [174].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings eine erhöhte Zytotoxizität der V δ 2 [IL-2/IL-15 + IL-10] T-Zellen und eine, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant erhöhte CD107a Oberflächenmobilisierung nach Stimulation (i.e. V δ 2 [IL-2/IL-15]) (Abb. 12). Außerdem wurde als möglicher Mediator einer erhöhten Zytotoxizität eine signifikant höhere intrazelluläre Granzym B Expression festgestellt (Abb. 13). Für NK-Zellen liegen vergleichbare Beobachtungen vor, so zeigten Wang *et al.*, dass IL-10 bei frisch isolierten aber auch ex vivo expandierten humanen NK-Zellen über metabolische Veränderungen im *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) Signalweg die Granzym B- und IFN- γ Freisetzung, die CD107a Oberflächenexpression, sowie die Effektorfunktionen verstärkt [175]. Auch in dieser Arbeit konnten mit Hilfe der partikelbasierten Multiplex-Analyse von löslichen Mediatoren höhere Mengen von IFN- γ bestimmt werden. Außerdem fanden sich größere Mengen von CCL22, IL-5, IL-13 und TNF- α (Abb. 14). Eine IL-10 vermittelte erhöhte Granzym B sowie IFN- γ Freisetzung beobachteten auch Mumm *et al.* bei tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen [171].

Rojas *et al.* hingegen beschreiben *in vitro* für humane mit lebendem *Mycobacterium tuberculosis* bzw. anti-CD3 mAk stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von IL-10 sowohl eine Inhibition der Proliferation als auch eine Suppression der IFN- γ Produktion [155]. Ebenso stellten Rowbottom *et al.* und Groux *et al.* nach *in vitro* Expansion

humaner CD8⁺ αβ T-Zellen bei alleiniger Anwesenheit von IL-10 eine Abnahme der Proliferation wie auch der Zytotoxizität fest [145, 176].

Diese zu den Ergebnissen dieser Arbeit gegensätzlichen Ergebnisse sind möglicherweise durch Unterschiede in der Kombination mit weiteren Zytokinen bedingt. In vorliegender Arbeit erfolgte eine simultane Zugabe von IL-2 und IL-10, wohingegen bei Rojas *et al.*, Groux *et al.* und Rowbottom *et al.* eine solche Kombination nicht erfolgte. Auch andere Arbeiten deuten *in vitro* bei murinen und humanen CD8⁺ αβ T-Zellen darauf hin, dass IL-10 als alleiniger Faktor keinen Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung besitzt, sondern dass die Verstärkung der Proliferation und des zytotoxischen Potentials nur in Kombination mit IL-2 auftritt. So konnte IL-10 allein in der Untersuchung von Chen und Zlotnik bei Con A-aktivierten FACS-gesorteten CD8⁺ murinen T-Zellen keine Proliferation und dementsprechend keine Differenzierung induzieren, wohingegen die Kombination aus IL-10 und IL-2 verglichen mit IL-2 allein zur einer Steigerung der Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen mit höherem zytotoxischen Potential führte [146]. Auch Santin *et al.* verwendeten in ihrer Arbeit IL-10 und IL-2 in Kombination, was humane Papillomavirus E7-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit gesteigerter zytotoxischer Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (IL-2 allein) induzierte [167].

Die, in der vorliegenden Arbeit beobachtete, verstärkte Produktion von IL-5 und IL-13 der mit IL-10 und IL-2 bzw. IL-15 differenzierten γδ T-Zellen, deutet auf die Induktion eines TH₂ ähnlichen Zytokinprofils hin, zudem wurde eine vermehrte Freisetzung von CCL22 festgestellt. Eine Analyse des Transkriptionsfaktorprofils zur weiteren Charakterisierung der Zellen konnte im Rahmen vorliegender Arbeit leider nicht mehr erfolgen, wäre jedoch für weiterführende Untersuchungen sinnvoll. Bisher ist nicht bekannt, dass IL-10 zu einer verstärkten TH₂-Differenzierung führen kann, jedoch können TH₂-Zellen IL-10 produzieren [177]. Hirata *et al.* beschrieben allerdings, dass CCL22 im Kontext atopischer Erkrankungen als autokriner Faktor, die *in vitro* Differenzierung naiver humaner CD4⁺ T-Zellen zu TH₂-Zellen verstärkt [178]. Ein vergleichbarer Mechanismus könnte möglicherweise auch bei der in vorliegender Arbeit beobachteten verstärkten Freisetzung von IL-5 und IL-13 ein Einflussfaktor sein. Im Rahmen einer adoptiven T-Zell-basierten Immuntherapie liegt das Hauptaugenmerk zurzeit zum größten Teil auf dem Transfer von autologen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. TH₂-Zellen werden im tumorimmunologischen Kontext häufig eher als Tumorwachstums fördernd beschrieben [179]. Jedoch gibt es auch

Untersuchungen, die auf einen möglichen effektiven Einsatz von T_{H2} -Zellen bei Immuntherapien hindeuten [180–182]. Beispielsweise konnten Lorvik *et al.* im Mausmodell am Myelom zeigen, dass Tumor-spezifische T_{H2} -Zellen *in vivo* über eine Typ 2 Inflammationsreaktion und die dadurch hervorgerufene Infiltration des Tumors durch Arginase produzierende M2-Makrophagen eine Tumor zerstörende Wirkung entfalten können [183]. Zur weiteren Einordnung der funktionellen Bedeutung des T_{H2} -Zytokinprofils, der in dieser Arbeit mit IL-10 behandelten V δ 2 T-Zellen, müssen noch weitere Untersuchungen erfolgen. Auch die erhöhte Degranulation der Zellen deutet darauf hin, dass IL-10 in Kombination mit IL-2 oder IL-15 eine Rolle bei der Differenzierung von V δ 2 T-Zellen besitzt, die aber in weiterführenden Experimenten noch besser charakterisiert werden sollte.

Für in Anwesenheit von IL-2 und TGF- β kultivierte, humane V γ 9 T-Zellen beschrieben Capiotto *et al.* *in vitro* eine Abnahme der Zytotoxizität gegenüber Lymphomzellen verglichen mit IL-2 kultivierten V γ 9 T-Zellen [158]. Entgegen der erwarteten TGF- β -abhängigen Abnahme des zytotoxischen Potentials, zeigte sich in dieser Arbeit jedoch sowohl bei der Echtzeit Impedanzmessung (RTCA) als auch in der Calcein-Freisetzung Analyse eine signifikant höhere Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrolle (i.e. IL-2/IL-15 allein) (Abb. 8,9). Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Feststellungen könnte die unterschiedlichen Zellkulturbedingungen der Zellen darstellen. So wurde TGF- β in der vorliegenden Arbeit während der V δ 2 T-Zell-Expansion durchgängig dem Zellmedium zugesetzt, wodurch die Aktivierung und die darauffolgende Differenzierung der V δ 2 T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β stattfand. Capiotto *et al.* hingegen gaben es lediglich in den letzten 48h vor der Zytotoxizitätsmessung zu den V γ 9 $\gamma\delta$ T-Zellen hinzu, sodass TGF- β in diesem Fall nur einen kurzzeitigen Effekt hatte und somit keinen Einfluss auf die Differenzierung nehmen konnte. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zur TGF- β -abhängigen Differenzierung von V δ 2 T-Zellen stehen in Einklang mit den Untersuchungen zur Zytotoxizität. Die mit TGF- β kultivierten Zellen besaßen den größten Anteil an T_{EM} -Zellen und insgesamt die meisten zytotoxischen Effektorzellen [T_{EM} und T_{EMRA} (CD27-CD45RA $^+$)] (Abb. 6). Es ist beschrieben, dass V δ 2 T_{EM} -Zellen und T_{EMRA} -Zellen ein großes zytotoxisches Potential und die Fähigkeit IFN- γ und TNF- α zu produzieren besitzen, wohingegen T CM -Zellen im Allgemeinen weniger zytotoxisch sind, dafür aber

ähnlich wie T_{Naiv} -Zellen gut proliferieren können [154]. Verglichen mit dem Anteil an Effektorzellen bei der V δ 2 T-Zellexpansion mit IL-2 (+/-IL-10+/-TGF- β), war die Summe von T_{EM} -Zellen und T_{EMRA} -Zellen bei Kultivierung mit IL-15 (+/-IL-10 +/-TGF- β) höher, was mit einer höheren Zytotoxizität dieser Zellen korrelierte (Abb. 6,8,9).

Um nachzuweisen, dass das höhere zytotoxische Potential tatsächlich durch TGF- β bzw. den von diesem induzierten SMAD-abhängigen Signalweg hervorgerufen wird, wurde ein Inhibitor (SB431542) der Activin Receptor-like Kinasen (ALK) 4, 5 und 7 verwendet. Dieser verhindert die Activin-abhängige Phosphorylierung von SMAD 2, wodurch es zu einer spezifischen Hemmung dieses Signalweges kommt [184]. Dies ist insofern interessant, weil SMAD-abhängige Signale sonst eher im Zusammenhang mit der Induktion immunsuppressiver Funktionen beschrieben sind [150]. SB431542 hat keinen Einfluss auf die SMAD-unabhängigen TGF- β -induzierten Signalwege, und auch nicht auf ALK-1, -2, -3, and -6 abhängigen Signalwege wie den *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-Signalweg. Bei der Anwendung des Inhibitors zeigte sich ein dosisabhängiger Rückgang der Zytotoxizität (Abb. 11). V δ 2 T-Zellen, welche mit IL-15 + TGF- β und SB431542 expandiert wurden, zeigten eine vergleichbare zytotoxische Aktivität wie die Kontrollen ohne TGF- β . Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Steigerung des zytotoxischen Potentials durch TGF- β und insbesondere dessen SMAD-abhängigen Signale hervorgerufen wird, was zeigt, dass dieser Signalweg auch für die Differenzierung von (V δ 2) T-Zellen mit zytotoxischem Potential relevant ist.

Um die Effektormechanismen, die zur erhöhten zytotoxische Aktivität TGF- β -expandierter V δ 2 T-Zellen führen, zu verstehen, analysierten wir die Degranulation der V δ 2 T-Zellen anhand der CD107a Oberflächenmobilisierung. Allerdings konnten wir bei TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen gegenüber den Kontrollzellen keine verstärkte, stattdessen aber eine deutlich geringere CD107a Oberflächenmobilisierung feststellen (Abb. 12). Das erhöhte zytotoxische Potential TGF- β -expandierter V δ 2 T-Zellen scheint also nicht mit einer verstärkten Degranulation von LAMP-1 positiven Granula zu korrelieren. Als eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre u.a. die Vermittlung der Zytotoxizität über LAMP-1 negative Granula denkbar [185, 186]. Außerdem käme als Erklärung auch eine zielgerichteter ablaufende Degranulation bei verstärkter Interaktion zwischen Effektor-

und Tumorzelle in Frage, was im nächsten Textabschnitt genauer beleuchtet werden soll.

Im Weiteren wurde die intrazelluläre Expression von TNF- α , IFN- γ , Perforin und Granzym B bestimmt (Abb. 13). Hierbei fiel eine signifikant höhere Expression von IFN- γ in mit TGF- β expandierten V δ 2 T-Zellen auf, was eine weitere mögliche Erklärung für deren verstärkte Zytotoxizität darstellt. Aus klinischen Studien ist bei verschiedenen Tumorerkrankungen ein Zusammenhang zwischen positivem Krankheitsverlauf und IFN- γ Antwort bekannt [187]. In weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte durch Einsatz eines anti-IFN- γ Antikörpers gezeigt werden, dass die erhöhte IFN- γ -Produktion zur gesteigerten Zytotoxizität beiträgt [188]. Inwiefern IFN- γ direkt als zytotoxisches Effektmolekül wirken kann, ist jedoch bisher nicht völlig verstanden. Einige Veröffentlichungen beschreiben allerdings einen direkten Effekt von IFN- γ auf Tumorzellen. Zum Beispiel berichten Detjen *et al.* *in vitro* von einer Apoptoseinduktion über Caspase 1 abhängige Signalwege in humanen Pankreaskarzinomlinien durch IFN- γ [189]. Des Weiteren gibt es eine Arbeit von Zhou *et al.*, die zeigt, dass IFN- γ *in vitro* die Expression von Gasdermin B (GSDMB) in verschiedenen humanen epithelialen Tumoren steigern kann, was die Granzym A induzierte Pyroptose dieser Zellen vermittelt [190]. Außerdem wäre auch ein direkter Einfluss der $\gamma\delta$ T-Zellen als Ursache der gesteigerten Lyse von Tumorzellen denkbar: So beschreiben Bhat *et al.* eine motilitäts- und geschwindigkeitssteigernde para- und autokrine Wirkung von IFN- γ auf CD8 $^+$ T-Zellen, welche zu einer Erhöhung der kontaktvermittelten Zytotoxizität der Zellen führte [191]. Bei in Anwesenheit von IL-2 und TGF- β expandierten V δ 2 T-Zellen (i.e. V δ 2 [IL-2 + TGF- β +/- IL-10]) wurden darüber hinaus eine signifikant höhere Produktion von TNF- α und Granzym B festgestellt, was eine weitere Erklärung für das gesteigerte zytotoxische Potential, der mit TGF- β expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen sein könnte.

6.4 TGF- β -abhängige Induktion von IL-9 produzierenden CD103 $^+$ V δ 2 T-Zellen mit hoher Zytotoxizität

Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass mit TGF- β und IL-15 expandierte humane V δ 2 T-Zellen *in vitro* große Mengen IL-9 produzieren [52]. Um festzustellen, ob diese IL-9-Produktion deren gesteigerten zytotoxischen Potential

zugrunde liegt, wurde in dieser Arbeit ein anti-IL-9 Antikörper verwendet (Abb. 15). Der Einsatz des neutralisierenden Antikörpers beeinflusste die Zytotoxizität der TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen jedoch nicht, sodass davon ausgegangen werden kann, dass IL-9 für die direkte Zytotoxizität gegen die untersuchten PDAC Zelllinien *in vitro* keine Rolle spielt. Allerdings gibt es Veröffentlichungen, welche direkte zytotoxische Effekte von IL-9 auf Tumorzellen beschreiben. Miao *et al.* berichten im Mausmodell von einer Apoptose Induktion in Plattenepithelkarzinomen durch von T H_9 -Zellen produziertem IL-9 [192]. Nalleweg *et al.* beobachteten *in vitro* einen wachstumshemmenden Effekt von IL-9 auf humane kolorektale Adenokarzinomzelllinien (Caco-2) [193]. Darüber hinaus zeigen weitere Arbeiten indirekte anti-tumor Effekte sowohl über Induktion einer angeborenen sowie auch einer adaptiven Immunantwort im Mausmodell. So wurden etwa demonstriert, dass eine IL-9-vermittelte Mastzellaktivierung das Wachstum von Melanomen hemmen kann, und dass IL-9 zu einer Erhöhung der CCL20 Produktion, damit zur Rekrutierung dendritischer Zellen und infolgedessen zu einer gesteigerten Expansion tumorspezifischer CD8 $^{+}$ ZTL in Lungenmetastasen führte kann [194, 195]. Des Weiteren gibt es Hinweise für eine durch IL-9 gesteigerte über Granzym B und Perforin vermittelte Zytotoxizität von humanen CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ doppelpositiven T-Zellen *in vitro* [196]. Eine sich möglicherweise besonders gut für eine adoptiv T-Zell-basierte Immuntherapie eignende CD8 $^{+}$ IL-9 produzierende T-Zellsubpopulation (Tc 9 -Zellen) beschreiben Arbeiten von Lu *et al.* [197, 198]. In diesen konnten sie zeigen, dass die unter T H_9 -polarisierenden Zytokinbedingungen *in vitro* differenzierten CD8 $^{+}$ T-Zellen zwar weniger zytotoxisches Potential (verglichen mit Tc 1 -Zellen) besaßen, jedoch aufgrund einer höheren Apoptoseresistenz über eine bessere *in vivo* Persistenz verfügten und eine niedrigere Oberflächenexpression von inhibitorischen Rezeptoren, wie PD-1, KLRG-1 und LAG-3 aufwiesen. Zudem konnten die Zellen nachdem sie in Mäuse transferiert wurden, einen Effektorzellphänotyp annehmen. Insgesamt führte der Transfer dieser Zellen zu einer effektiveren Reduktion der Tumormasse, verglichen mit dem Transfer von Tc 1 -Zellen. Es ist also durchaus nicht unwahrscheinlich, dass IL-9, auch wenn es in den *in vitro* Experimenten dieser Arbeit keinen direkten Einfluss auf die Zytotoxizität hatte, die *in vivo* anti-Tumor-Aktivität, beispielweise im Rahmen eines adoptiven V δ 2 T-Zelltransfers, deutlich steigern könnte.

Auf der Suche nach einer Erklärung für die gesteigerte Zytotoxizität der mit TGF- β kultivierten V δ 2 T-Zellen stellte unsere Arbeitsgruppe außerdem eine charakteristische

Veränderung des Musters vorhandener Zelladhäsionsmoleküle fest [188]. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Expression von CD54, CD103 und CD106 sowie eine verminderte Expression von CD56 und LFA-1. Es ist bekannt, dass TGF- β in verschiedenen T-Zellsubpopulationen CD103 induzieren kann. CD103 (auch Intergin α E [ITGAE]) ist ein vor allem auf intraepithelialen T-Lymphozyten vorkommendes Zelladhäsionsmolekül, welches eine Rolle bei der Leitung der Lymphozyten zum Zielgewebe spielt. Le Floc'h *et al.* beobachteten eine verstärkte CD103 Oberflächenexpression bei mit TGF- β und einem CD3-Stimulus expandierten CD8 $^{+}$ H32-22 T-Zellklonen [199]. Eine Expansion mit TGF- β alleine hatte nur einen geringfügigen Anstieg der CD103 Oberflächenexpression zur Folge. Auch Jabeen *et al.* beschreiben bei naiven humanen CD4 $^{+}$ T-Zellen, die *in vitro* unter TGF- β -beinhaltenden Zytokinbedingungen (i.e. zur T_{H9}-, T_{reg}-, T_{H17}-Zelldifferenzierung) kultiviert wurden, eine höhere Expression des für CD103 kodierenden Gens (ITGAE), sowie eine höhere CD103 Oberflächenexpression. Beides wurde bei Zellen die unter T_{H1} oder T_{H2} Zellkulturbedingungen expandiert wurden nicht festgestellt. Die höchste (Oberflächen-)Expression wurde hierbei in T_{H9}-Zellen gemessen [200].

E-Cadherin, der Ligand von CD103, findet sich typischerweise auf Epithelzellen. Auch Tumorzellen epithelialen Ursprungs, die den größten Anteil aller menschlichen Tumore ausmachen, wie etwa Tumorzellen des PDAC, besitzen häufig E-Cadherin auf ihrer Oberfläche [201]. Es wurde gezeigt, dass CD103 einen unmittelbaren, verstärkenden Einfluss auf die Invasion von CD8 $^{+}$ T-Zellen in epithiale Tumoren hat [169]. Eine gesteigerte Oberflächenexpression von CD103 auf Tumor-infiltrierenden Lymphozyten korrelierte außerdem bei Ovarialkarzinomen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen mit besseren Überlebensraten [168, 202]. Hiermit konsistent ist die von Le Floc'h *et al.* beschriebene durch CD103 induzierte Erhöhung der Zytotoxizität von CD8 $^{+}$ H32-22 T-Zellklonen aus peripheren humanen Blutleukozyten gegenüber autologen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomlinien [199]. Unsere Arbeitsgruppe konnte auf vorliegender Arbeit aufbauenden, weiterführenden Untersuchungen zeigen, dass CD103 in der zytolytischen Synapse zwischen V δ 2 T-Zelle und Tumorzelle vorhanden ist und entscheidend zu der erhöhten Zytotoxizität von TGF- β -expandierten V δ 2 T-Zellen beitragen kann [188]. Wie zuvor für humane CD8 $^{+}$ T-Zellklone beschrieben [203] fand sich auch bei V δ 2 T-Zellen eine funktionelle Redundanz von CD11a/CD18 (LFA-1) und CD103 [188]. Um bei Immuntherapien eine effektive Infiltration der Effektorzellen in den Tumor zu fördern und ein hohes

tumorspezifisches zytotoxisches Potential zu generieren, könnte die *ex vivo* Induktion von CD103 in T-Zellen eine interessante Möglichkeit darstellen.

Zusammenfassend können die, in dieser Arbeit und darüber hinaus von Peters *et al.* charakterisierten, TGF- β -expandierten V δ 2 T(9)-Zellen eine geeignete Zellpopulation für den adoptiven T-Zelltransfer im Rahmen einer Tumor-Immuntherapie darstellen. Aufgrund ihrer hohen Zytotoxizität und der Fähigkeit IL-9 zu produzieren besitzen sie ein hohes Potential Tumorzellen effektiv zu zerstören.

7 Zusammenfassung

Aufgrund ihres zytotoxischen Potentials gegenüber Tumorzellen verschiedener Entitäten, der Fähigkeit $\alpha\beta$ T-Zellen Antigene zu präsentieren und Antigene HLA-unabhängig zu erkennen eignen sich V δ 2 T-Zellen sehr gut als Effektorzellen für Tumorimmuntherapien. Da das Ansprechen auf Tumorimmuntherapien mit V δ 2 T-Zellen in bisherigen klinischen Studien jedoch nur gering war, ist es notwendig den Einfluss des Tumors und seiner Umgebung auf die Lymphozyten besser zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der häufig im Tumormikromilieu vorkommenden suppressions-assoziierten Zytokine IL-10 und TGF- β auf die Zytotoxizität humaner V δ 2 T-Zellen gegen Tumorzellen *in vitro* untersucht. Dabei wurden initial mit einem phosphorylierten Antigen (pAg)-Stimulus aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen für 15 Tage in Anwesenheit von IL-10 bzw. TGF- β in Kombination mit IL-2 oder IL-15 expandiert. Mit IL-10 und IL-2 bzw. IL-15 kultivierte V δ 2 T-Zellen zeigten hierbei eine verringerte Proliferation sowie eine leicht gesteigerte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen [i.e. IL-2 bzw. IL-15 allein]. Die Degranulation von IL-10 behandelten $\gamma\delta$ T-Zellen war, gemessen anhand der CD107a Oberflächenmobilisierung nach Restimulation mit Tumorantigenen bzw. pAg, signifikant erhöht. TGF- β behandelte $\gamma\delta$ T-Zellen hingegen wiesen eine geringere Degranulation auf, proliferierten aber nach anfänglicher Verzögerung stärker als die Kontrollzellen und besaßen eine signifikant höhere zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen. Passend hierzu wies ein großer Anteil der TGF- β behandelte Zellen einen *effector memory* Phänotyp (T_{EM} , CD27 $^+$ CD45RA $^-$) und eine stärkere Produktion von IFN- γ auf. Durch Verwendung eines SMAD-Inhibitors konnte bewiesen werden, dass die gesteigerte Zytotoxizität der mit TGF- β kultivierten Lymphozyten in Abhängigkeit des TGF- β induzierten SMAD Signalweg vermittelt wurde.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IL-10 und TGF- β bei isolierter Betrachtung anders als ursprünglich vermutet, einen positiven Einfluss auf die anti-Tumoraktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen ausüben. Die *in vitro* Expansion von V δ 2 T-Zellen unter Verwendung von TGF- β und/ oder IL-10 könnte eine vielversprechende Möglichkeit zur Erzeugung von V δ 2 T-Zellen mit erhöhter anti-Tumoraktivität für einen adoptiven Zelltransfer zur Tumorimmuntherapie darstellen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Murphy KM, Weaver C. Janeway's immunobiology. 9th ed. New York, London: GS Garland Science Taylor & Francis Group; 2017.
- [2] Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2019.
- [3] Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alphabeta receptors. *Journal of molecular biology* 2000;295(4):979–95.
- [4] Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994;76(2):263–74.
- [5] Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual Review of Immunology* 2006;24:419–66.
- [6] Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annual Review of Immunology* 2009;27(1):591–619.
- [7] Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews. Immunology* 2003;3(12):939–51.
- [8] Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annual Review of Immunology* 2006;24:65–97.
- [9] Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological reviews* 2009;229(1):114–25.
- [10] Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Frontiers in oncology* 2018;8:86.
- [11] Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015;33(17):1974–82.
- [12] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman C, Glimcher LH. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 2000;100(6):655–69.
- [13] Zheng W, Flavell RA. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 1997;89(4):587–96.

- [14] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ et al. The orphan nuclear receptor ROR γ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126(6):1121–33.
- [15] Huang G, Wang Y, Chi H. Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals. *Cellular & molecular immunology* 2012;9(4):287–95.
- [16] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology* 2007;8(9):950–7.
- [17] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology* 2008;9(12):1347–55.
- [18] Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: Follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica* 2010;95(3):356–8.
- [19] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775–87.
- [20] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)* 2003;299(5609):1057–61.
- [21] Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 1999;190(7):995–1004.
- [22] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine* 2000;192(2):303–10.
- [23] Weninger W, Manjunath N, Andrian UH von. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological reviews* 2002;186:221–33.
- [24] Bucy RP, Chen CL, Cooper MD. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1989;142(9):3045–9.
- [25] Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *Journal of Experimental Medicine* 1989;169(4):1277–94.

- [26] Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W et al. Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 1990;343(6260):754–7.
- [27] Holtmeier W, Kabelitz D. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* 2005;86:151–83.
- [28] Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *The Journal of investigative dermatology* 2006;126(1):25–31.
- [29] Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* 2013;13(2):88–100.
- [30] Schondelmaier S, Wesch D, Pechhold K, Kabelitz D. Vy gene usage in peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. *Immunology Letters* 1993;38(2):121–6.
- [31] Wesch D, Hinz T, Kabelitz D. Analysis of the TCR V γ repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals. *International immunology* 1998;10(8):1067–75.
- [32] Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. gammadelta T cells in cancer immunotherapy: Current status and future prospects. *Immunotherapy* 2009;1(4):663–78.
- [33] Hinz T, Wesch D, Halary F, Marx S, Choudhary A, Arden B et al. Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry. *International immunology* 1997;9(8):1065–72.
- [34] Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg H-H, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 2008;213(3-4):173–82.
- [35] Kabelitz D. Human $\gamma\delta$ T cells: From a neglected lymphocyte population to cellular immunotherapy: A personal reflection of 30 years of $\gamma\delta$ T cell research. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 2016;172:90–7.
- [36] Kalyan S, Kabelitz D. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: A biographical sketch of the highly empathetic. *Cellular & molecular immunology* 2013;10(1):21–9.
- [37] Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews. Immunology* 2010;10(7):467–78.
- [38] Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science (New York, N.Y.)* 1998;279(5357):1737–40.

- [39] Luoma AM, Castro CD, Mayassi T, Bembinster LA, Bai L, Picard D et al. Crystal structure of V δ 1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* 2013;39(6):1032–42.
- [40] Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT et al. CD1d-lipid antigen recognition by the $\gamma\delta$ TCR. *Nature immunology* 2013;14(11):1137–45.
- [41] Russano AM, Bassotti G, Agea E, Bistoni O, Mazzocchi A, Morelli A et al. CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2007;178(6):3620–6.
- [42] Jomaa H, Feurle J, Lühs K, Kunzmann V, Tony HP, Herderich M et al. Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS immunology and medical microbiology* 1999;25(4):371–8.
- [43] Chen ZW, Letvin NL. Vgamma2Vdelta2+ T cells and anti-microbial immune responses. *Microbes and infection* 2003;5(6):491–8.
- [44] Bürk MR, Mori L, Libero G de. Human V gamma 9-V delta 2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *European journal of immunology* 1995;25(7):2052–8.
- [45] Thompson K, Rojas-Navea J, Rogers MJ. Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood* 2006;107(2):651–4.
- [46] Espinosa E, Belmant C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagné F et al. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(21):18337–44.
- [47] Pietschmann K, Beetz S, Welte S, Martens I, Gruen J, Oberg H-H et al. Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 2009;70(3):245–55.
- [48] Wesch D, Beetz S, Oberg H-H, Marget M, Krengel K, Kabelitz D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2006;176(3):1348–54.

- [49] Marischen L, Wesch D, Oberg H-H, Rosenstiel P, Trad A, Shomali M et al. Functional expression of NOD2 in freshly isolated human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. Scandinavian journal of immunology 2011;74(2):126–34.
- [50] Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C et al. Differentiation of effector/memory V δ 2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. Journal of Experimental Medicine 2003;198(3):391–7.
- [51] Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournié JJ, Meraviglia S et al. CXCR5 identifies a subset of V γ 9V δ 2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950) 2006;177(8):5290–5.
- [52] Peters C, Häslер R, Wesch D, Kabelitz D. Human V δ 2 T cells are a major source of interleukin-9. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2016;113(44):12520–5.
- [53] Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. gammadelta T cells: An important source of IL-17. Current opinion in immunology 2008;20(3):353–7.
- [54] Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. Cellular immunology 2001;212(2):110–7.
- [55] Peters C, Oberg H-H, Kabelitz D, Wesch D. Phenotype and regulation of immunosuppressive V δ 2-expressing $\gamma\delta$ T cells. Cellular and molecular life sciences CMLS 2014;71(10):1943–60.
- [56] Kabelitz D, Peters C, Wesch D, Oberg H-H. Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells. International immunopharmacology 2013;16(3):382–7.
- [57] Lamb LS, Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ et al. Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. Bone marrow transplantation 2001;27(6):601–6.
- [58] Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: From the bench to the bedside. British journal of haematology 2013;160(2):123–32.
- [59] Bank I, Marcu-Malina V. Quantitative peripheral blood perturbations of $\gamma\delta$ T cells in human disease and their clinical implications. Clinical reviews in allergy & immunology 2014;47(3):311–33.

- [60] Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature medicine* 2015;21(8):938–45.
- [61] Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Wevers E et al. Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2012;189(10):5029–36.
- [62] Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 2014;40(5):785–800.
- [63] Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: Friend or foe in cancer development? *Journal of translational medicine* 2018;16(1):3.
- [64] Helm O, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C et al. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PloS one* 2014;9(5):e94357.
- [65] Oberg H-H, Grage-Griebenow E, Adam-Klages S, Jerg E, Peipp M, Kellner C et al. Monitoring and functional characterization of the lymphocytic compartment in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreatology official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 2016;16(6):1069–79.
- [66] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: A pilot study. *Cancer immunology, immunotherapy CII* 2007;56(4):469–76.
- [67] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Minato N, Tanabe K. 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* 2011;60(8):1075–84.
- [68] Dieli F, Vermijlen D, Fulfarò F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G et al. Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* 2007;67(15):7450–7.
- [69] Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G et al. In vivo manipulation of V γ 9V δ 2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clinical and experimental immunology* 2010;161(2):290–7.

- [70] Noguchi A, Kaneko T, Kamigaki T, Fujimoto K, Ozawa M, Saito M et al. Zoledronate-activated V γ 9 γ δ T cell-based immunotherapy is feasible and restores the impairment of γδ T cells in patients with solid tumors. *Cytotherapy* 2011;13(1):92–7.
- [71] Fournié J-J, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagné F et al. What lessons can be learned from γδ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cellular & molecular immunology* 2013;10(1):35–41.
- [72] Wesch D, Kabelitz D, Oberg H-H. Tumor resistance mechanisms and their consequences on γδ T cell activation. *Immunological reviews* 2020;298(1):84–98.
- [73] Oberg HH, Kellner C, Gonnermann D, Sebens S, Bauerschlag D, Gramatzki M et al. Tribody (HER2)2xCD16 Is More Effective Than Trastuzumab in Enhancing γδ T Cell and Natural Killer Cell Cytotoxicity Against HER2-Expressing Cancer Cells. *Frontiers in immunology* 2018;9:814.
- [74] Oberg H-H, Peipp M, Kellner C, Sebens S, Krause S, Petrick D et al. Novel bispecific antibodies increase γδ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer research* 2014;74(5):1349–60.
- [75] Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PW. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nature reviews. Drug discovery* 2019;18(8):585–608.
- [76] Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2013/2014: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut); 2017.
- [77] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021;71(1):7–33.
- [78] Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, Miguel A de et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clinical & translational oncology official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2005;7(5):189–97.
- [79] Owens DK, Davidson KW, Krist AH, Barry MJ, Cabana M, Caughey AB et al. Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *JAMA* 2019;322(5):438–44.
- [80] Tannapfel A. Pankreaskarzinom. Molekulare und chirurgische Pathologie. *Der Pathologe* 2010;31 Suppl 2:225–8.

- [81] Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003;2(1):14.
- [82] Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kleeff J. Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Experimental oncology* 2010;32(3):128–31.
- [83] Tien Y-W, Wu Y-M, Lin W-C, Lee H-S, Lee P-H. Pancreatic carcinoma cells stimulate proliferation and matrix synthesis of hepatic stellate cells. *Journal of hepatology* 2009;51(2):307–14.
- [84] Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2009;7(11 Suppl):S44-7.
- [85] Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 2005;128(4):907–21.
- [86] Evans A, Costello E. The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion. *Front. Physio.* 2012;3:270.
- [87] Roshani R, McCarthy F, Hagemann T. Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. *Cancer letters* 2014;345(2):157–63.
- [88] Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI et al. Enhanced expression of transforming growth factor β isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 1993;105(6):1846–56.
- [89] Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Löhr JM et al. Pancreatic cancer microenvironment. *International journal of cancer* 2007;121(4):699–705.
- [90] Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman RM, Endo I. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Annals of gastroenterological surgery* 2019;3(2):130–7.
- [91] Karamitopoulou E. Tumour microenvironment of pancreatic cancer: immune landscape is dictated by molecular and histopathological features. *British journal of cancer* 2019;121(1):5–14.
- [92] Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology & Therapeutics* 2003;98(2):257–65.
- [93] Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine* 2000;342(18):1350–8.

- [94] Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 1998;16:137–61.
- [95] Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: Structural features and mechanisms of activation. *Kidney international* 1997;51(5):1376–82.
- [96] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development* 2000;14(2):163–76.
- [97] Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 1998;67:753–91.
- [98] Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF- β pathway into the cellular signalling network. *Cellular Signalling* 2002;14(12):977–88.
- [99] Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science signaling* 2019;12(570).
- [100] Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nature reviews. Immunology* 2010;10(8):554–67.
- [101] Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1995;155(3):1066–73.
- [102] Malygin AM, Meri S, Timonen T. Regulation of natural killer cell activity by transforming growth factor-beta and prostaglandin E2. *Scandinavian journal of immunology* 1993;37(1):71–6.
- [103] Lee J-C, Lee K-M, Kim D-W, Heo DS. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2004;172(12):7335–40.
- [104] Halliday GM, Le S. Transforming growth factor-beta produced by progressor tumors inhibits, while IL-10 produced by regressor tumors enhances, Langerhans cell migration from skin. *International immunology* 2001;13(9):1147–54.
- [105] Kehrl JH. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine* 1986;163(5):1037–50.

- [106] Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2001;167(2):773–8.
- [107] Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2000;165(9):4773–7.
- [108] Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 2002;195(11):1499–505.
- [109] Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature reviews. Immunology* 2004;4(11):900–11.
- [110] Lin JT, Martin SL, Xia L, Gorham JD. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: Differential involvement of Stat4 and T-bet. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2005;174(10):5950–8.
- [111] Bönig H, Banning U, Hannen M, Kim YM, Verheyen J, Mauz-Körholz C et al. Transforming growth factor-beta1 suppresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 1999;50(6):612–8.
- [112] Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC. Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 1991;146(10):3289–97.
- [113] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-J, Li L, Marinos N et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198(12):1875–86.
- [114] Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nature immunology* 2008;9(6):632–40.

- [115] Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448(7152):484–7.
- [116] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24(2):179–89.
- [117] David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2018;19(7):419–35.
- [118] Seoane J, Gomis RR. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2017;9(12).
- [119] Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008;121(5):1108–11.
- [120] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine* 1989;170(6):2081–95.
- [121] Yssel H, Waal Malefyt R de, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H et al. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1992;149(7):2378–84.
- [122] Moore KW, Waal Malefyt R de, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 2001;19:683–765.
- [123] Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *The Journal of clinical investigation* 2008;118(3):1132–42.
- [124] Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: Examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *International journal of cancer* 1994;56(5):755–60.
- [125] Itakura E, Huang R-R, Wen D-R, Paul E, Wünsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence.

- Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 2011;24(6):801–9.
- [126] Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine* 1996;183(6):2559–69.
- [127] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology* 2010;10(3):170–81.
- [128] Yoon SI, Logsdon NJ, Sheikh F, Donnelly RP, Walter MR. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(46):35088–96.
- [129] Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *The EMBO journal* 1997;16(19):5894–903.
- [130] Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan AA, Advani J, Gowda H et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *Journal of cell communication and signaling* 2016;10(1):61–7.
- [131] Waal Malefyt R de, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE de. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1991;174(5):1209–20.
- [132] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 1991;147(11):3815–22.
- [133] D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal of Experimental Medicine* 1993;178(3):1041–8.
- [134] Gruber MF, Williams CC, Gerrard TL. Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 1994;152(3):1354–61.

- [135] Marfaing-Koka A, Maravic M, Humbert M, Galanaud P, Emilie D. Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *International immunology* 1996;8(10):1587–94.
- [136] Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1999;163(3):1537–44.
- [137] Willems F, Marchant A, Delville JP, Gérard C, Delvaux A, Velu T et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *European journal of immunology* 1994;24(4):1007–9.
- [138] Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1993;151(3):1224–34.
- [139] Waal Malefyt R de, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 1991;174(4):915–24.
- [140] Sredni B, Weil M, Khomenok G, Lebenthal I, Teitz S, Mardor Y et al. Ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop. *Cancer research* 2004;64(5):1843–52.
- [141] Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *International journal of cancer* 1997;71(4):630–7.
- [142] Del Prete G, Carli M de, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1993;150(2):353–60.
- [143] Groux H, Bigler M, Vries JE de, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1996;184(1):19–29.

- [144] Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103(2):131–6.
- [145] Groux H, Bigler M, Vries JE de, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1998;160(7):3188–93.
- [146] Chen WF, Zlotnik A. IL-10: A novel cytotoxic T cell differentiation factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1991;147(2):528–34.
- [147] Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(5):1890–3.
- [148] Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *The Journal of clinical investigation* 1994;93(1):424–8.
- [149] Rousset F, Peyrol S, Garcia E, Vezzio N, Andujar M, Grimaud JA et al. Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *International immunology* 1995;7(8):1243–53.
- [150] Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019;50(4):924–40.
- [151] Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer research* 1968;28(7):1300–10.
- [152] Pulvertaft R. CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA). *The Lancet* 1964;283(7327):238–40.
- [153] Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M, Klöppel G. 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* 2003;442(5):444–52.
- [154] Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology* 2012;136(3):283–90.
- [155] Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infection and immunity* 1999;67(12):6461–72.

- [156] Marx S, Wesch D, Kabelitz D. Activation of human gamma delta T cells by *Mycobacterium tuberculosis* and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 1997;158(6):2842–8.
- [157] Pechhold K, Wesch D, Schondelmaier S, Kabelitz D. Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by *Mycobacterium tuberculosis*. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 1994;152(10):4984–92.
- [158] Capietto A-H, Martinet L, Cendron D, Fruchon S, Pont F, Fournié J-J. Phosphoantigens overcome human TCRVgamma9+ gammadelta Cell immunosuppression by TGF-beta: Relevance for cancer immunotherapy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2010;184(12):6680–7.
- [159] Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology* 2013;43(11):2797–809.
- [160] Wang X-Y, Fisher PB (eds.). *Immunotherapy of cancer*. Cambridge, MA: Academic Press; 2019.
- [161] Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2007;178(7):4022–6.
- [162] Reiser J, Sadashivaiah K, Furusawa A, Banerjee A, Singh N. Eomesodermin driven IL-10 production in effector CD8+ T cells promotes a memory phenotype. *Cellular immunology* 2019;335:93–102.
- [163] Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-γ when combined with IL-18. *European journal of immunology* 1999;29(9):2658–65.
- [164] Parato KG, Kumar A, Badley AD, Sanchez-Dardon JL, Chambers KA, Young CD et al. Normalization of natural killer cell function and phenotype with effective anti-HIV therapy and the role of IL-10. *AIDS* (London, England) 2002;16(9):1251–6.
- [165] Kundu N, Fulton AM. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cellular immunology* 1997;180(1):55–61.

- [166] Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, Kurimoto M, van Deventer SJ, van der Poll T. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2000;165(5):2783–9.
- [167] Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Roman JJ et al. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology* 2000;74(10):4729–37.
- [168] Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, Montpréville V de et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2015;194(7):3475–86.
- [169] Boutet M, Gauthier L, Leclerc M, Gros G, Montpreville V de, Théret N et al. TGF β Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer research* 2016;76(7):1757–69.
- [170] Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, LaFace D, Truong H, McClanahan T et al. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer research* 2012;72(14):3570–81.
- [171] Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S et al. IL-10 elicits IFNy-dependent tumor immune surveillance. *Cancer cell* 2011;20(6):781–96.
- [172] Hsu P, Santner-Nanan B, Hu M, Skarratt K, Lee CH, Stormon M et al. IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 2015;195(8):3665–74.
- [173] Mocellin S. The dual role of IL-10. *Trends in Immunology* 2003;24(1):36–43.
- [174] Costa Brandão Berti F, Brajão de Oliveira K. IL-10 in cancer: Just a classical immunosuppressive factor or also an immunostimulating one? *AIMS Allergy and Immunology* 2018;2(2):88–97.
- [175] Wang Z, Di Guan, Huo J, Biswas SK, Huang Y, Yang Y et al. IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling. *Frontiers in immunology* 2021;12:619195.
- [176] Rowbottom AW, Lepper MA, Garland RJ, Cox CV, Corley EG. Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology* 1999;98(1):80–9.

- [177] Ng THS, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology* 2013;4:129.
- [178] Hirata H, Yukawa T, Tanaka A, Miyao T, Fukuda T, Fukushima Y et al. Th2 cell differentiation from naive CD4+ T cells is enhanced by autocrine CC chemokines in atopic diseases. *Clinical and experimental allergy journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2019;49(4):474–83.
- [179] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* 2010;11(10):889–96.
- [180] Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue antigens* 2007;70(1):1–11.
- [181] Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P et al. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *Journal of Experimental Medicine* 2003;197(3):387–93.
- [182] Shen Y, Fujimoto S. A tumor-specific Th2 clone initiating tumor rejection via primed CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activation in mice. *Cancer research* 1996;56(21):5005–11.
- [183] Lorvik KB, Hammarström C, Fauskanger M, Haabeth OAW, Zangani M, Haraldsen G et al. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer research* 2016;76(23):6864–76.
- [184] Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD et al. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* 2002;62(1):65–74.
- [185] Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Lysosome-Related Effector Vesicles in T Lymphocytes and NK Cells. *Scandinavian journal of immunology* 2015;82(3):235–43.
- [186] Lettau M, Armbrust F, Dohmen K, Drews L, Poch T, Dietz M et al. Mechanistic peculiarities of activation-induced mobilization of cytotoxic effector proteins in human T cells. *International immunology* 2018;30(5):215–28.

- [187] Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology* 2018;9:847.
- [188] Peters C, Meyer A, Kouakanou L, Feder J, Schricker T, Lettau M et al. TGF- β enhances the cytotoxic activity of V δ 2 T cells. *Oncolmmunology* 2019;8(1):e1522471.
- [189] Detjen KM, Farwig K, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut* 2001;49(2):251–62.
- [190] Zhou Z, He H, Wang K, Shi X, Wang Y, Su Y et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science (New York, N.Y.)* 2020;368(6494).
- [191] Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell death & disease* 2017;8(6):e2836.
- [192] Miao B-P, Zhang R-S, Sun H-J, Yu Y-P, Chen T, Li L-J et al. Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by Staphylococcal enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion. *Cellular & molecular immunology* 2017;14(4):371–9.
- [193] Nalleweg N, Chiriac MT, Podstawa E, Lehmann C, Rau TT, Atreya R et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. *Gut* 2015;64(5):743–55.
- [194] Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nature medicine* 2012;18(8):1248–53.
- [195] Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of clinical investigation* 2012;122(11):4160–71.
- [196] Parrot T, Allard M, Oger R, Benlalam H, La Raingeard de Blétière D, Coutolleau A et al. IL-9 promotes the survival and function of human melanoma-infiltrating CD4(+) CD8(+) double-positive T cells. *European journal of immunology* 2016;46(7):1770–82.
- [197] Lu Y, Hong B, Li H, Zheng Y, Zhang M, Wang S et al. Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for

- adoptive immunotherapy of cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(6):2265–70.
- [198] Lu Y, Wang Q, Yi Q. Anticancer Tc9 cells: Long-lived tumor-killing T cells for adoptive therapy. *Oncolimmunology* 2014;3:e28542.
- [199] Le Floc'h A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204(3):559–70.
- [200] Jabeen R, Goswami R, Awe O, Kulkarni A, Nguyen ET, Attenasio A et al. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *The Journal of clinical investigation* 2013;123(11):4641–53.
- [201] Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker-Denk-Heitz-Moch (eds.). *Pathologie: Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch; www.studentconsult.de]*. 4th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2008.
- [202] Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20(2):434–44.
- [203] Franciszkiewicz K, Le Floc'h A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, Mami-Chouaib F. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer research* 2013;73(2):617–28.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Formulierung des spannenden Dissertationsthemas gemeinsam mit Herrn Dr. Christian Peters, die sorgfältige Betreuung und die ständige Hilfsbereitschaft gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Daniela Wesch.

Mein aufrichtiger Dank geht außerdem an Herrn Professor Kabelitz und Herrn Professor Scheffold für die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Immunologie anfertigen zu können.

Im Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. Christian Peters für die umfangreiche Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten danken. Ich bin dankbar, dass er mir in allen Belangen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine konstante und geduldige Betreuung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des immunologischen Instituts Kiel, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft das Arbeiten bereichert und erleichtert haben. Hervorheben möchte ich hier vor allem Ina, Hoa, Moni und Sandra sowie Guranda.

Außerdem möchte ich meiner Familie und dabei insbesondere Tobi für die stetige Unterstützung, Nachsicht und Ermutigung danken. Außerdem danke ich ganz besonders meiner Mutter für ihr großes Vertrauen in mich und die stetige finanzielle sowie mentale Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich meiner langjährigen Freundin Linda für ihre liebevolle und humorvolle Begleitung in Bezug auf diese Arbeit und allen sonstigen Angelegenheiten danken.

9.2 Publikationsverzeichnis

9.2.1 Publikationen

Peters C*, **Meyer A***, Kouakanou L, Feder J, Schricker T, Lettau M, Janssen O, Wesch D & Kabelitz D. (2018 Sep 26). TGF- β enhances the cytotoxic activity of V δ 2 T cells. *Oncoimmunology*, 8(1), e1522471.

*geteilte Erstautorenschaft

9.2.2 Konferenzbeiträge

9.2.2.1 Vorträge

Meyer A, Peters C, Kabelitz D and Wesch D. "Effect of TGF- β 1 and IL-10 on the cytotoxicity of human $\gamma\delta$ T lymphocytes" Vorgestellt auf dem 38. Symposium of the North German Immunologists Oktober 2015 in Borstel.

Meyer A, Peters C, Kabelitz D and Wesch D. "Influence of suppression-associated cytokines on cytotoxic potential of human $\gamma\delta$ T lymphocytes" Vorgestellt auf dem 19. Joint Meeting of the Signal Transduction Society November 2015 in Weimar.

9.2.2.2 Poster

Meyer A, Peters C, Kabelitz D and Wesch D. "Influence of suppression-associated cytokines on cytotoxic potential of human $\gamma\delta$ T lymphocytes" Vorgestellt auf dem Tag der medizinischen Fakultät Dezember 2015 in Kiel.