

# **Galektin-3 in der Interaktion von T Zellen und Tumorzellen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Daniel Gonnermann**

Kiel, 2018

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Daniela Wesch  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2018





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zellen des Immunsystem . . . . .	1
1.2	Duktales Pankreas Adenokarzinom und Ovarialkarzinom . . . . .	6
1.3	<i>tumor escape</i> Mechanismen . . . . .	10
1.4	Galektine . . . . .	13
1.5	Fragestellung . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Geräte . . . . .	21
2.2	Materialien . . . . .	22
2.3	Medien und Puffer . . . . .	23
2.4	Stimulanzien und Zusätze . . . . .	26
2.5	Testsysteme . . . . .	26
2.6	Antikörper . . . . .	27
2.7	siRNA . . . . .	29
2.8	Patientinnen . . . . .	29
2.9	Zelllinien . . . . .	30
2.10	Software . . . . .	30
2.11	Statistik . . . . .	31
2.12	Zellbiologische Methoden . . . . .	31
2.12.1	Kultivierung von Zellen . . . . .	31
2.12.2	Kryokonservierung von Zellen . . . . .	31
2.12.3	Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut . . . . .	32
2.12.4	Isolation von Tumor-Azites-Lymphozyten . . . . .	32
2.12.5	Isolation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten . . . . .	33
2.12.6	Etablierung von Tumorzellen aus Tumorgewebe oder Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom . . . . .	33
2.12.7	Magnetische Separation verschiedener Zellpopulationen . . . . .	34
2.12.8	Generierung von kurzzeit $\gamma\delta$ T Zelllinien . . . . .	34
2.12.9	Generierung von kurzzeit $\alpha\beta$ T Zelllinien . . . . .	35
2.12.10	Herrunterregulation von Galektin-3 mit siRNA . . . . .	35
2.12.11	Analyse der Zellmigration im Wundheilungsassay . . . . .	36

## Inhaltsverzeichnis

2.12.12	Analyse von Tumorzellen mit dem xCelligence System . . . . .	36
2.12.13	<sup>51</sup> Chrom Freisetzungstest . . . . .	37
2.13	Durchflusszytometrie . . . . .	37
2.13.1	Oberflächenmarkierung . . . . .	38
2.13.2	Intrazelluläre Markierung . . . . .	38
2.13.3	Absolutzellzahlbestimmung mittels <i>standard cell dilution analysis</i> . . . . .	39
2.13.4	Bestimmung der Degranulation . . . . .	40
2.13.5	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen . . . . .	41
2.13.6	Lokalisation und Kolokalisation von Galektin-3 . . . . .	41
2.13.7	Analyse der Synapsen zwischen Tumorzellen und T Zellen . . . . .	42
2.14	Biochemische Methoden . . . . .	44
2.14.1	Herstellung von Zelllysaten . . . . .	44
2.14.2	Proteinbestimmung . . . . .	44
2.14.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	44
2.14.4	Western Blot . . . . .	45
2.14.5	Sandwich ELISA . . . . .	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	PDAC Zellen exprimieren Galektin-3 . . . . .	47
3.2	Funktion von Galektin-3 in Tumorzellen . . . . .	52
3.3	Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen . . . . .	56
3.3.1	PDAC Zellen und T Zellen alleine setzen wenig Galektin-3 frei . . . . .	56
3.3.2	Einfluss der Kokultur von Tumorzellen und T Zellen auf die Freisetzung von Galektin-3 und Galektin-9 . . . . .	61
3.3.3	Galektin-3 in Kokultur wird von den Tumorzellen freigesetzt . . . . .	66
3.3.4	Galektin-3 Freisetzung in Kokultur ist zellkontaktabhängig . . . . .	68
3.4	Einfluss von Galektin-3 auf die $\gamma\delta$ T Zell-vermittelte Lyse von PDAC Zellen . . . . .	69
3.5	Galektin-9 jedoch nicht Galektin-3 induziert Zelltod in $\gamma\delta$ T Zellen . . . . .	74
3.6	Galektin-3 inhibiert die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen . . . . .	75
3.7	Die Mehrzahl der PDAC Zellen inhibiert die Proliferation von T Zellen . . . . .	76
3.8	Aus Tumorzellen freigesetztes Galektin-3 inhibiert die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen . . . . .	77
3.9	$\beta 1\alpha 3$ Integrin ist beteiligt an der Proliferationsinhibition . . . . .	79
3.10	Galektin-3 wird durch PDAC Zellen in Kokultur mit T Zellen in die Zellperipherie relokalisiert . . . . .	82

3.11 Primäre Ovarialkarzinom Zellen inhibieren partiell die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen . . . . .	85
3.12 Verteilung von $\gamma\delta$ T Zellen im Blut, Aszites und Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen . . . . .	87
<b>4 Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1 Expression von Galektin-3 in PDAC Zellen und Ovarialkarzinom Zellen . . . . .	91
4.2 Freisetzung von Galektinen durch PDAC Zellen . . . . .	93
4.3 Mechanismen der Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen . . . . .	95
4.4 Galektine inhibieren die Proliferation von T Zellen . . . . .	97
4.5 Ausblick . . . . .	105
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
5.1 Zusammenfassung . . . . .	107
5.2 Summary . . . . .	108
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>141</b>
6.1 Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von weiteren PDAC Zellen mit frisch isolierten T Zellen . . . . .	141
6.2 Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von weiteren PDAC Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien . . . . .	142
6.3 Freisetzung von Galekin-9 in Kokulturen von Tumorzellen mit frisch isolierten T Zellen . . . . .	144
6.4 Freisetzung von Galekin-9 in Kokulturen von Tumorzellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien . . . . .	147
6.5 Neutralisierende Antikörper beeinflussen die $\gamma\delta$ T Zellproliferation . . . . .	150
6.6 Lebenslauf . . . . .	151
6.7 Publikationsliste . . . . .	152
6.7.1 Originalarbeiten . . . . .	152
6.7.2 Vortrag und Posterpräsentationen . . . . .	152
6.7.3 Preise und Auszeichnungen . . . . .	155
6.8 Erklärung . . . . .	156
6.9 Danksagung . . . . .	157





# Abkürzungsverzeichnis

A/E-Beads	.....	Aktivierungs-/Expansions-Partikel
APZ	.....	Antigen präsentierende Zelle
ATCC	.....	<i>American type culture collection</i>
BrHPP	.....	Bromohydrin Pyrophosphat
BSA	.....	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinder Serum Albumin
bsAk	.....	bispezifischer Antikörper
BTN	.....	Butyrophilin
CD	.....	<i>Cluster of differentiation</i>
CRD	.....	<i>Carbohydrate recognition domain</i> , Kohlenhydraterkennungsdomäne
EDTA	.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	.....	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	.....	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
Fab	.....	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	.....	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	.....	Fluorescein Isothiocyanat
FPPS	.....	Farnesyl-Pyrophosphat Synthase
GlcNAc	.....	N-Acetyl-Glukosamin
HER-2	.....	<i>Human epithelial growth factor receptor-2</i>
HLA	.....	Humanes Leukozytenantigen
HMB-PP	.....	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphat
IFN	.....	Interferon
IL	.....	Interleukin
IPMN	.....	<i>Intraductal papillary mucinous neoplasias</i>
IPP	.....	Isopentenyl-Pyrophosphat
LacNAc	.....	N-Acetyl-Lactosamin
LAMP	.....	<i>Lysosomal-associated membrane protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
n-BP	Aminobisphosphonat
PBMZ	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> , Duktales Pankreasadenokarzinom
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RTCA	<i>Real time cell analyzer</i>
SCDA	<i>Standard cell dilution analysis</i>
scFv	<i>Single chain fragment of the variable region</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
T <sub>H</sub>	T Helferzelle
T <sub>reg</sub>	regulatorische T Zelle
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TUZ	Tumorzellen
TZR	T Zell Rezeptor

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellen des Immunsystem

Um den Körper des Menschen vor Krankheiten zu schützen, hat sich ein Immunsystem entwickelt, welches in zwei Komponenten aufgeteilt wird: Das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zum angeborenen Immunsystem zählen natürliche Barrieren wie z.B. die Haut und humorale Bestandteile wie das Komplementsystem, Zytokine, Chemokine oder antimikrobielle Peptide. Natürliche Killerzellen (NK Zellen), Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen (DZ) und Granulozyten, welche in neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten unterteilt werden, bilden die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems. Diese können u.a. Krankheitserreger wie Bakterien phagozytieren und dann abtöten (Makrophagen, Neutrophile Granulozyten) oder auch virusinfizierte oder entartete Zellen abtöten (NK-Zellen). Antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie z.B. Makrophagen, DZ oder B Lymphozyten nehmen Antigene auf und können sie Zellen der adaptiven Immunantwort über humane Leukozytenantigen (HLA)-Moleküle präsentieren. B Lymphozyten, die neben T Lymphozyten ein Bestandteil des zellulären Teils des adaptiven Immunsystems sind, besitzen mit dem B Zell Rezeptor einen Antigenerkennungsrezeptor auf der Oberfläche und sezernieren nach Antigenerkennung und zusätzlichen Signalen durch T Helferzellen Antikörper, welche die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort bilden.  $\alpha\beta$  T Zellen stellen den größten Anteil der T Zellen im Blut dar und erkennen über HLA-Moleküle präsentierte Peptide. T Helferzellen, die neben dem T Zell Rezeptor (TZR) den CD4-Korezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren, können von APZ über HLA Klasse II (HLA II) Moleküle präsentierte Antigene erkennen und dann nach weiteren aktivierenden Signalen die Immunantwort durch Makrophagen, B Zellen oder zytotoxische T Zellen modulieren. Über HLA II werden im Allgemeinen Peptide von extrazellulären Proteinen, die im endolysosomalen Kompartiment von z.B. Cathepsin-Proteasen prozessiert werden, präsentiert. Über HLA I Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, werden hingegen zelleigene Peptide von z.B. über das Proteasom degradierten Proteinen präsentiert. Dies spielt insbesondere bei der Immunantwort von zytotoxischen  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T Zellen gegenüber intrazellulären Pathogenen und Viren eine Rolle. Auch exogene Antigene können über MHC I direkt  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T Zellen präsentiert werden (Carbone and Bevan, 1990; Moore et al., 1988). Dieser Prozess wird als *cross-presentation* bezeichnet.

## 1 Einleitung

Neben Signalen über den TZR und CD4 sowie CD8 ist für die vollständige Aktivierung und zur Induktion der Proliferation von T Zellen eine Kostimulation notwendig. Hierbei spielen u.a. Moleküle der B7-Familie (CD80/CD86) und der CD28-Familie eine wichtige Rolle. CD80 oder CD86, welche auf APZ exprimiert werden, binden zur Kostimulation an CD28 auf T Zellen. Hierdurch wird u.a. über die Src Kinase Lck das TZR-Signal verstärkt (zusammengefasst in Zumerle et al., 2017). Bei CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen ist das kostimulatorische Signal wichtig für die IL-2 Produktion. Bleibt das kostimulatorische Signal bei TZR Stimulation aus, führt dies zur Anergie der T Zelle. Auch andere Mitglieder der CD28-Familie wie z.B. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein* (CTLA)-4 oder *programmed death* (PD)-1 kompetitieren mit CD28 um die Bindung an CD80 oder CD86. CTLA-4 und CD28 haben gegensätzliche Effekte auf die Aktivierung von T Zellen. Während CD28 ein aktivierendes Signal liefert, sorgt CTLA-4, das auch als Immun-Checkpoint-Molekül bezeichnet wird, für inhibitorische Signale und supprimiert die T Zelle (Esensten et al., 2016). Auch Adhäsionsmoleküle wie Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der T Zellaktivierung. *Lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-1 bestehend aus CD18 ( $\beta$ 2 Integrin) und CD11a ( $\alpha$ L Integrin) bildet neben *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 in der immunologischen Synapse einen zentralen Bestandteil des peripheren supramolekularen Aktivierungsclusters (pSMAC). Auch die Bindung von  $\beta$ 1-Integrin (CD29), das häufig mit  $\alpha$ 1-6 Ketten assoziiert (CD49a-f), an Zielstrukturen vermittelt zusätzliche Signale, die für die IL-2 Produktion und Proliferation von T Zellen wichtig sind (Iwata et al., 2000). Im zentralen supramolekularen Aktivierungscluster (cSMAC) der Synapse sind neben dem TZR/CD3-Komplex die Korezeptoren lokalisiert. Bindet der TZR ein Antigen und erhält kostimulatorische Signale, wird über die Phosphorylierung der CD3 $\epsilon$ - und CD3 $\zeta$ -Ketten die *zeta-chain-associated protein kinase* (ZAP)-70 rekrutiert. Dies führt über weitere Zwischenschritte zur Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). PLC- $\gamma$  löst verschiedene weitere Signalwege aus, die letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B) oder *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) im Zellkern führen, die dann die Transkription von Genen für Proliferation, Effektorfunktionen und Differenzierung auslösen (Murphy et al., 2009).

Nach der Antigenerkennung können naive T Zellen abhängig vom Zytokinmilieu in verschiedene T Zellsubpopulationen differenzieren. Diese werden anhand der von ihnen freigesetzten Zytokine unterteilt. T Helferzellen oder zytotoxische T Zellen Typ 1 (T<sub>H</sub>1 oder T<sub>c</sub>1 Zellen) setzen meist Interleukin (IL)-2, Interferon (IFN)- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  frei und exprimieren den Transkriptionsfaktor *T-Box expressed in T cells* (T-bet) (Szabo et al., 2000). Die Differenzierung in T<sub>H</sub>1/T<sub>c</sub>1-Richtung wird dabei durch IL-12 und IFN- $\gamma$  gesteuert, wohingegen die Differenzierung in T<sub>H</sub>2/T<sub>c</sub>2-Richtung durch IL-4 gesteuert wird. T<sub>H</sub>2 Zellen setzen

u.a. IL-4, IL-5 und IL-13 frei und exprimieren den Transkriptionsfaktor *GATA binding protein 3* (GATA-3) (Zheng and Flavell, 1997). Die für die Differenzierung der jeweiligen Subpopulationen notwendigen Zytokine wirken dabei der Differenzierung in die jeweils andere Subpopulation entgegen. Zusätzlich sind noch weitere Differenzierungsstadien wie z.B. T<sub>H</sub>9 und T<sub>H</sub>17 Subpopulationen beschrieben. T<sub>H</sub>9 Zellen sind charakterisiert durch die Freisetzung von IL-9, welches bei Allergien eine Rolle spielt. Naive CD4<sup>+</sup> T Zellen werden durch IL-4 und TGF- $\beta$  in T<sub>H</sub>9-Richtung polarisiert (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Außerdem spielen die Transkriptionsfaktoren PU.1 und *interferon regulatory factor* (IRF) 4 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung (Chang et al., 2010; Staudt et al., 2010). T<sub>H</sub>17 Zellen, die eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielen, setzen IL-17, IL-21 und IL-22 frei, aktivieren dadurch Neutrophile Granulozyten und exprimieren den Transkriptionsfaktor *retinoic acid receptor related orphan receptor  $\gamma$*  (ROR $\gamma$ ) (Ivanov et al., 2006). Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen in Richtung T<sub>H</sub>17 benötigt IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-23 (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Dong, 2008; Wilson et al., 2007). *B follicular helper T cells* (T<sub>FH</sub>) ist eine T Zell Subpopulation, die auf die Hilfe von B Zellen in Form von z.B. CD40-Kostimulation oder IL-21 Freisetzung spezialisiert ist. Erhalten B Zellen eine Kostimulation über CD40, werden sie vollständig zur Teilung aktiviert und migrieren in die Peripherie der Follikel (Coffey et al., 2009). Im Menschen sind TGF- $\beta$ , IL-12 und IL-23 an der Differenzierung zu T<sub>FH</sub> Zellen beteiligt, was zur charakteristischen Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 und des kostimulatorischen Moleküls *inducible T cell costimulator* (ICOS), des Transkriptionsfaktors *B cell lymphoma* (BCL)-6 und der Freisetzung von IL-21 führt (Schmitt et al., 2014). Regulatorische T Zellen (T<sub>reg</sub>) sind immunsuppressiv und vermitteln dadurch die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Man unterscheidet zwischen natürlichen und induzierten T<sub>reg</sub>. Sowohl natürliche T<sub>reg</sub> (nT<sub>reg</sub>) als auch induzierte T<sub>reg</sub> (iT<sub>reg</sub>) sind gekennzeichnet durch eine starke Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) sowie des Transkriptionsfaktors *Forkhead box protein 3* (FoxP3) (Hori et al., 2003). Während nT<sub>reg</sub> FoxP3 konstitutiv exprimieren, ist für die Differenzierung zu iT<sub>reg</sub> *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ , das neben IL-10 auch von den iT<sub>reg</sub> selbst gebildet wird, wichtig (Asseman et al., 1999). Über diese immunsuppressiven Zytokine können iT<sub>reg</sub> Effektor T Zellen supprimieren, während nT<sub>reg</sub> Effektor T Zellen eher über verschiedene immunsuppressive Oberflächenmoleküle wie PD1 oder CTLA-4 supprimieren (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000).

$\gamma\delta$  T Lymphozyten besitzen sowohl Eigenschaften der angeborenen Immunität als auch der adaptiven Immunität. Im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T Lymphozyten erkennen sie ihre Antigene HLA-unabhängig und benötigen deshalb weder CD4 noch CD8, die beide meist auch nicht von  $\gamma\delta$  T Zellen exprimiert werden.  $\gamma\delta$  T Zellen machen im Blut des Menschen nur ca. 5% der CD3<sup>+</sup>

## 1 Einleitung

T Zellen aus, können jedoch in epithelialen Geweben, insbesondere in der Haut oder im Darm, deutlich höhere Anteile einnehmen (Itohara et al., 1990; Kalyan and Kabelitz, 2013). Man unterscheidet Subpopulationen von  $\gamma\delta$  T Zellen anhand ihrer sechs V $\delta$ -Elemente (V $\delta$ 1-6), von denen V $\delta$ 1 und V $\delta$ 2 am besten charakterisiert sind. V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen kommen hauptsächlich im Blut vor, wohingegen V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen eher in epithelialen Geweben wie z.B. im Darm zu finden sind (Deusch et al., 1991; Kabelitz et al., 2005). Das V $\delta$ 2-Element des  $\gamma\delta$  TZR assoziiert hauptsächlich mit dem V $\gamma$ 9-Element des  $\gamma\delta$  TZR. Im Gegensatz dazu kann das V $\delta$ 1-Element des  $\gamma\delta$  TZR mit verschiedenen V $\gamma$ -Elementen (V $\gamma$ 2,3,4,5, 8 oder 9) assoziieren (Schondelmaier et al., 1993; Wesch et al., 1998). Die theoretische Rezeptordiversität ist bei  $\gamma\delta$  T Zellen ähnlich groß wie bei  $\alpha\beta$  T Zellen, allerdings werden *in vivo* vergleichsweise wenig Elemente genutzt. Im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T Zellen, die ihre Antigene über HLA-Moleküle präsentiert bekommen, erkennen  $\gamma\delta$  T Zellen ihre Antigene HLA-unabhängig. Für V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen gibt es Hinweise, dass diese über CD1d Moleküle präsentierte Antigene erkennen können (Luoma et al., 2013). Zu den wenigen bisher identifizierten Liganden für V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen gehört u.a. *MHC class I related chain A* (MICA), welches nicht nur über den TZR, sondern auch über *natural killer group 2 member D* (NKG2D)-Rezeptoren erkannt werden kann (Groh et al., 1998; Xu et al., 2011). V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen können über ihren TZR phosphorylierte Stoffwechselprodukte der Isoprenoid-Biosynthese, sogenannte Phosphoantigene, erkennen (Morita et al., 1995; Tanaka et al., 1995). Diese werden dem TZR über einen Mechanismus präsentiert, der das Molekül Butyrophilin (BTN) 3A1 involviert (Harly et al., 2012). Hierbei wurde zunächst ein Mechanismus vorgeschlagen, der von der Bindung von Phosphoantigenen an die extrazelluläre Domäne von BTN3A1 und die direkte Präsentation an den  $\gamma\delta$  TZR ausgeht (Vavassori et al., 2013). In letzter Zeit verdichten sich jedoch die Hinweise, dass Phosphoantigene eher an die intrazelluläre B30.2 Domäne von BTN3A1 binden und die Aktivierung des  $\gamma\delta$  TZR weitere Moleküle benötigt (Rhodes et al., 2015; Riaño et al., 2014; Salim et al., 2017; Sandstrom et al., 2014; Vantourout et al., 2018; Wang and Morita, 2015). Mikrobielle Phosphoantigene wie z.B. (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphat (HMB-PP) können V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen dabei in pico- bis nanomolaren Konzentrationen aktivieren. Pyrophosphate wie Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) werden z.B. in Prokaryoten im Nicht-Mevalonatweg gebildet. Auch im Menschen wird IPP im Mevalonatweg gebildet, welches  $\gamma\delta$  T Zellen allerdings nicht aktiviert, da es erst in mikromolaren Konzentrationen für V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen aktivierend wirkt (Hintz et al., 2001; Puan et al., 2007). Einige Tumore, in denen die Isoprenoidbiosynthese dysreguliert ist, akkumulieren IPP in deutlich höheren Konzentrationen welches dann  $\gamma\delta$  T Zellen aktiviert und ihre zytotoxische Kapazität induziert (Gober et al., 2003). Außerdem können klinisch lizenzierte Aminobisphosphonate (n-BP) wie Zoledronat verwendet werden, um

die Farnesyl-Pyrophosphat Synthase (FPPS) im eukaryotischen Mevalonatweg zu inhibieren, was zu einer Akkumulation von IPP und damit zu einer Stimulation von  $V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen führt (Roelofs et al., 2009). Für die Kostimulation von  $\gamma\delta$  T Zellen sind kostimulatorische Faktoren wie ICOS/ICOSL oder CD40L/CD40 wichtig, wohingegen CD28 eine eher untergeordnete Rolle spielt. Neben dem TZR kann die Aktivierung von  $V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen über verschiedene NK-Rezeptoren, wie z.B. NKG2D moduliert werden. So können  $V\gamma 9 V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen auch NKG2D Liganden wie MICA, -B oder UL16-bindende Proteine (ULBPs) über NKG2D erkennen, wobei der Einfluss des TZR oder von NKG2D auf die Lyse von Tumorzellen je nach Tumorzelle unterschiedlich ist (Chitadze et al., 2016; Peipp et al., 2017; Rincon-Orozco et al., 2005; Wrobel et al., 2007). Erkennt eine zytotoxische T Zelle oder NK Zelle ihre Zielzelle, werden unterschiedliche Effektormechanismen initiiert. Zum einen gehört dazu die Expression und Freisetzung von Todesliganden wie Fas Ligand (FasL) und *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) (Bossi and Griffiths, 1999; Takeda et al., 2001). Zum anderen wird über die Freisetzung der zytotoxischen Mediatoren Perforin und Granzym A oder Granzym B am Kontaktpunkt, der Synapse, Apoptose in den Zielzellen induziert. Dies kann auf der einen Seite durch die proteolytische Aktivierung von Caspasen in der Zielzelle geschehen, auf der anderen Seite kann Granzym B auch über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg Apoptose auslösen (Adrain et al., 2005; Medema et al., 1997; Pinkoski et al., 2001). Dies geschieht durch Spaltung von Bid, was dann über eine Oligomerisierung von Bax/Bak Molekülen zu Cytochrom C Freisetzung und der Induktion von Apoptose führt (Heibein et al., 2000; Sutton et al., 2000).

$V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen können anhand ihrer Oberflächenexpression von CD27 und CD45RA in funktionell unterschiedliche Phänotypen unterteilt werden. *Naive* ( $T_{naiv}$ ,  $CD27^+CD45RA^+$ ) und *central memory* ( $T_{cm}$ ,  $CD27^+CD45RA^-$ ) Subpopulationen befinden sich nicht in peripheren Geweben, exprimieren aber Chemokinrezeptoren für die Migration zu sekundären lymphatischen Organen. *Effector memory* ( $T_{EM}$ ,  $CD27^-CD45RA^-$ ) und *terminal differentiated effector memory* ( $T_{EMRA}$ ,  $CD27^-CD45RA^+$ ) Subpopulationen hingegen befinden sich in oder migrieren zu entzündeten Geweben und können Effektorfunktionen ausüben (Dieli et al., 2003b).  $\gamma\delta$  T Zellen besitzen neben ihrer zytotoxischen Funktion eine hohe Plastizität. Sie können abhängig vom Stimulus und dem umgebenden Zytokinmilieu in  $T_H2$ -,  $T_H9$ -,  $T_H17$  und  $T_{FH}$ -Richtung differenzieren (Caccamo et al., 2006; Peters et al., 2016; Roark et al., 2008; Wesch et al., 2001; Wu et al., 2014). Auch regulatorische  $\gamma\delta$  T Zellen sind beschrieben (Peters et al., 2014; Wesch et al., 2014). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  T Zellen Fragmente von Zellen über Phagozytose oder Trogozytose aufnehmen können (Poupot et al., 2005; Wu et al., 2009). Diese können dann von  $\gamma\delta$  T Zellen über HLA II präsentiert werden (Brandes et al., 2005; Himoudi

## 1 Einleitung

et al., 2012). Auch die *cross presentation* von Antigenen über HLA I spielt bei  $\gamma\delta$  T Zellen eine Rolle (Brandes et al., 2009; Landmeier et al., 2009; Meuter et al., 2010).  $\gamma\delta$  T Zellen vereinen also auf der einen Seite Funktionen der adaptiven Immunantwort, auf der anderen Seite auch Funktionen der angeborenen Immunität. Sie werden deshalb häufig als „Bindeglied“ zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem bezeichnet.

Da  $\gamma\delta$  T Zellen aufgrund ihrer HLA-unabhängigen Erkennung von Antigenen eine reduzierte *graft-versus-host*-Reaktion zeigen und in verschiedene Tumore infiltrieren und diese unter bestimmten Bedingungen lysieren können (wie beispielsweise in Melanomen oder *pancreas ductal adenocarcinoma* (PDAC) (Cordova et al., 2012; Oberg et al., 2014), sind sie für eine Immuntherapie von Tumoren besonders interessant. Mit Aminobisphosphonaten wie z.B. Zoledronat, das bei Patienten mit Knochenmetastasen eingesetzt wird, oder dem synthetischen Phosphoantigen Phosphostim (Innate Pharma) sind Stimulanzien für  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen für die Nutzung in klinischen Studien verfügbar. Hierfür sind zwei unterschiedliche Strategien möglich. Zum einen können  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen durch Gabe von Aminobisphosphonaten oder Phosphoantigenen im Patienten selektiv aktiviert werden. Zum anderen können  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen von Patienten isoliert und *in vitro* expandiert werden und dann autolog in hohen Zellzahlen in den Patienten zurückgegeben werden. Für beide Strategien ist die zusätzliche Gabe von IL-2 notwendig, das nur in sehr geringen Mengen selbst von  $\gamma\delta$  T Zellen produziert werden kann und für die Proliferation von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen notwendig ist (Pechhold et al., 1994b; Wesch et al., 1997). Beide Strategien wurden in verschiedenen klinischen Studien mit Patienten verschiedener Tumorerkrankungen mit moderatem Erfolg durchgeführt (Dieli et al., 2003a, 2007; Kobayashi et al., 2011a, 2007; Kunzmann et al., 2012; Nicol et al., 2011). Dies könnte zum Teil an der beobachteten aktivierungs-induzierten Erschöpfung (*exhaustion*) von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen nach wiederholter Stimulation liegen. Auch besitzen Krebspatienten häufig eine reduzierte Anzahl an  $V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen (Fournié et al., 2013; Oberg et al., 2014). Zusätzlich besitzen Tumore verschiedene *immune-escape* Mechanismen um einer Immunantwort durch  $\gamma\delta$  T Zellen zu entkommen (genauer beschrieben in Abschnitt 1.3).

## 1.2 Duktales Pankreas Adenokarzinom und Ovarialkarzinom

Das duktales Pankreas Adenokarzinom (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) ist eine extrem aggressive maligne gastrointestinale Erkrankung mit hoher Mortalität. Das PDAC ist zwar



## 1.2 Duktales Pankreas Adenokarzinom und Ovarialkarzinom

nur die 10. häufigste Krebserkrankung in den USA und in Deutschland, ist aber die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache (Siegel et al., 2017). Mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate in Deutschland von nur 8% weist das PDAC eine hohe Mortalität auf (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2015). Dies liegt unter anderem an dem späten Auftreten spezifischer Symptome, wodurch das PDAC erst spät diagnostiziert wird und dann häufig schon weit fortgeschritten und metastasiert ist. Eine chirurgische Resektion ist nur bei 20% der Patienten möglich, von denen 90% zwei Jahre nach der Operation Metastasen oder Rezidive aufweisen (Haugk, 2010). Schon in den frühen Vorläuferläsionen wie *pancreatic intraepithelial neoplasia* (PanIN) oder *intraductal papillary mucinous neoplasia* (IPMN) treten teilweise Treibermutationen wie z.B. im K-Ras Onkogen auf (Morris et al., 2010; Murtaugh, 2014), welche die starke Metastasierung des PDAC oder auch die Resistenz gegenüber einer Chemo- oder Strahlentherapie erklären könnten. Die Suche nach neuen Biomarkern und Therapieformen ist also dringend notwendig. Der Biomarker *carbohydrate antigen* (CA) 19-9 wird beim PDAC häufig bestimmt, ist jedoch aufgrund seiner niedrigen Sensitivität und Spezifität insbesondere für die Diagnose umstritten. Ca. 10% der kaukasischen Bevölkerung, die das Lewis-Antigen nicht besitzen, exprimieren selbst bei großen Tumoren kein CA 19-9 (Goonetilleke and Siriwardena, 2007). Weitere Biomarker wie *macrophage inhibitory cytokine* (MIC)-1, *tumor specific growth factor* (TSGF), *cell adhesion molecule* (CAM) 17.1, *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (CEACAM)-1 oder *regenerating islet-derived family, member* (REG) 4 wurden bisher erforscht, wobei REG4 neben dem Mucin 5A4 (detektiert durch den PAM4-Antikörper) ein möglicher Kandidat für die frühe Diagnose von PDAC ist (Eguia et al., 2012; Gold et al., 2013; Jiang et al., 2004; Koopmann et al., 2006; Simeone et al., 2007; Takayama et al., 2010; Yiannakou et al., 1997).

Weiterhin charakteristisch für das PDAC ist ein dichtes desmoplastisches Stroma, das aus extrazellulärer Matrix und verschiedenen immunsuppressiven Zellpopulationen besteht wie z.B. Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), Pankreassternzellen oder *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) (Lunardi et al., 2014). Sowohl im Blut als auch in Gewebe von PDAC Patienten ist im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Anzahl  $T_{reg}$  zu finden (Grage-Griebenow et al., 2014; Helm et al., 2014c; Oberg et al., 2016). In Gewebe von PDAC Patienten konnten hauptsächlich  $CD8^+$  und wenige  $CD4^+ \alpha\beta$  T Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis hauptsächlich  $CD4^+ \alpha\beta$  T Zellen detektiert (Helm et al., 2014c). Im Gegensatz zu Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis konnten  $\gamma\delta$  T Zellen in Gewebeschnitten von PDAC Patienten im Gangepithel nahe der Tumore und im benachbarten Stroma detektiert werden. In der Hälfte

## 1 Einleitung

der 41 analysierten Patienten war die Frequenz der  $\gamma\delta$  T Zellen im Gangepithel höher als die Frequenz von  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T Zellen (Helm et al., 2014c; Oberg et al., 2016, 2014). Da  $\gamma\delta$  T Zellen in PDAC Gewebe infiltrieren und einige PDAC Zellen nach Stimulation lysieren können, könnte eine Immuntherapie von PDAC mit  $\gamma\delta$  T Zellen eine alternative Therapie für das PDAC darstellen. In einer Phase I Pilotstudie, in der die Kombination von Gemcitabin mit einem adoptiven Transfer autologer  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen mit Gemcitabin allein verglichen wurde, konnte allerdings kein Unterschied im Überleben zwischen beiden Therapieansätzen festgestellt werden (Aoki et al., 2017). Es konnte aber die Tendenz festgestellt werden, dass Patienten, die nach fünfmaligem adoptiven Transfer von  $\gamma\delta$  T Zellen mehr als 20%  $\gamma\delta$  T Zellen im Blut aufwiesen, ein leicht verlängertes (aber nicht signifikantes) Überleben aufwiesen. In dieser Studie erhielten die Patienten allerdings weder IL-2 noch wurden die  $\gamma\delta$  T Zellen zusätzlich aktiviert.

Das Ovarialkarzinom ist eine maligne Erkrankung der Eierstöcke, die ähnlich wie das PDAC durch ein dichtes desmoplastisches Stroma charakterisiert ist (Luo et al., 2016). Da keine spezifischen Symptome existieren, erfolgt eine Diagnose meist erst in spätem Stadium, wodurch die Überlebenseaussichten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom schlecht sind. Das relative 5-Jahres-Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Deutschland beträgt etwa 41 % (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2015). Die Standardtherapie besteht aus der chirurgischen Entfernung des Tumors und anschließender Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel. Häufig treten allerdings Rezidive auf. Diese können teilweise über den Serummarker *cancer antigen* (CA)-125 identifiziert werden, sind jedoch häufig chemoresistent (Jayson et al., 2014). Neue Therapieansätze beinhalten unter anderem die Kombination von Chemotherapie mit Angiogenesehemmern. Der monoklonale anti-VEGF Antikörper Bevacizumab wird in mehreren klinischen Studien für das Ovarialkarzinom getestet und liefert erste vielversprechende Ergebnisse (Perren et al., 2011). Der humane epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor (HER)-2 ist sowohl im Tumor einiger PDAC Patienten als auch bei 2-87% der Ovarialkarzinom Patientinnen überexprimiert und kommt daher für eine mögliche Therapie in Betracht (Serrano-Olvera et al., 2006). Allerdings hängt die Überexpression vom Ovarialkarzinom ab (Carvajal-Hausdorf et al., 2017). Monoklonale Antikörper gegen HER-2 wie Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) werden erfolgreich bei Patientinnen mit Brustkrebs eingesetzt und wurden in Studien mit Patienten mit HER-2 positivem Ovarialkarzinom angewendet (Bookman et al., 2003; Jung et al., 2012; Loibl and Gianni, 2017). Trastuzumab verhindert die HER-2 Homodimerisierung, induziert Antikörpervermittelte Zytotoxizität und verhindert die Proliferation von Tumorzellen (Patel et al., 2014;

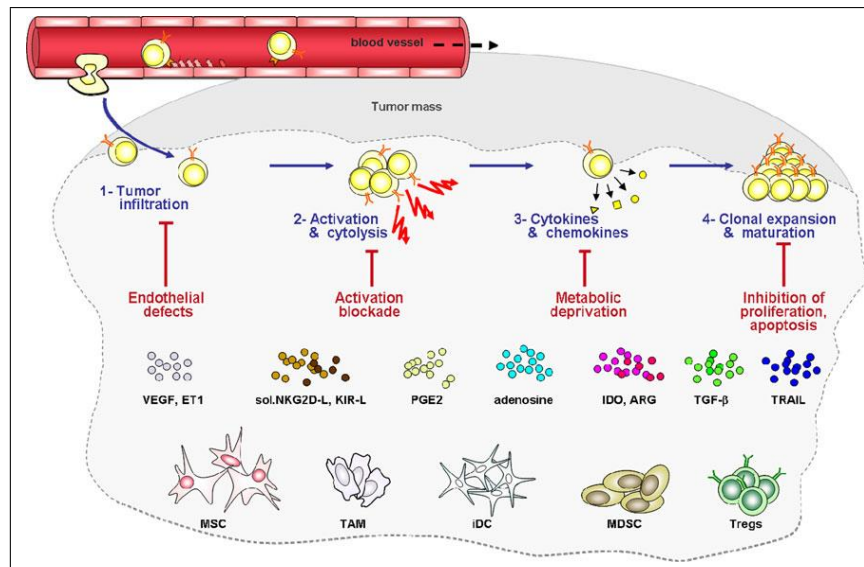
## 1.2 Duktales Pankreas Adenokarzinom und Ovarialkarzinom

Singh et al., 2014). Eine weitere Möglichkeit einer neuen HER2-Therapie stellen *chimeric antigen receptor* (CAR) T Zellen dar. Autologe T Zellen werden mit einem CAR bestehend aus einem *single chain fragment of the variable region* (scFv) fusioniert an intrazelluläre T Zell Signaldomänen transfiziert. Bei CARs der ersten Generation war das scFv an CD3 $\zeta$  gekoppelt, wohingegen CARs der zweiten und dritten Generation zusätzlich intrazelluläre Domänen von kostimulatorischen Molekülen wie z.B. CD28 enthalten (Houot et al., 2015). Für B Zell Lymphome zeigten sich vielversprechende Therapieergebnisse, was dazu führte, dass CARs mit Zielantigen CD19 im Sommer 2017 von der FDA für die Therapie von *acute lymphoblastic leukemia* (ALL) zugelassen wurde (Kochenderfer et al., 2015). Auch CARs mit Zielantigenen wie HER2 auf soliden Tumoren sind in der klinischen Erprobung. Eine erste Studie mit CAR T Zellen, die gegen HER2 gerichtet sind, rekrutiert neben Patienten mit u.a. Brust- und Lungenkrebs auch Patienten mit PDAC oder Ovarialkarzinom (clinicaltrials.gov identifier: NCT02713984). CAR T Zellen können Tumore HLA-unabhängig erkennen, sodass sie auch Tumore lysieren können, in denen HLA Moleküle herunterreguliert sind. Limitationen einer CAR T Zelltherapie bestehen u.a. in dem Verlust des CAR-spezifischen Antigens durch z.B. Selektion. Außerdem gibt es teilweise unspezifische Reaktionen (*off-target effects*) oder *cytokine release syndrom* (CRS) (Houot et al., 2015). Auch für die Verwendung von bispezifischen Antikörpern (bsAk) ist die Wahl des Antigens entscheidend. Im Gegensatz zu CAR T Zellen besitzen bsAk allerdings eine deutlich geringere Halbwertszeit, wodurch eine Immunantwort gegen das Antigen durch z.B. einstellen der Infusion leichter wieder abgeschaltet werden kann. Bispezifische Antikörper mit HER2 als Zielantigen wie [HER2xCD3] oder [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] wurden von der Arbeitsgruppe Wesch/Oberg in Kooperation mit Prof. Matthias Peipp und PD Dr. Christian Kellner aus der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie des UKSH Kiel entwickelt. [HER2xCD3] besteht aus zwei scFv, von denen eines eine Spezifität für das Tumorantigen HER2 und das andere eine Spezifität für das aktivierende CD3-Molekül auf T Zellen besitzt. [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] hingegen besteht aus einem *fragment antigen binding* (Fab), das an das V $\gamma$ 9-Element des  $\gamma\delta$  TZR bindet sowie aus zwei scFv mit Spezifität für HER2, wodurch eine erhöhte Avidität erreicht wird. [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in SCID-Beige Mäusen Lyse von PDAC Zellen durch T Zellen induzieren (Oberg et al., 2014). Durch die Verwendung von bsAk können T Zellen in Gegenwart immunsuppressiver Moleküle wie z.B. das von Tumorzellen oder anderen immunsuppressiven Zellen freigesetzte Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), aktiviert werden und die Tumorzellen lysieren (Gonnermann et al., 2015). Somit könnte die Verwendung von bsAk eine Möglichkeit sein *tumor escape* Mechanismen zu überwinden.

### 1.3 *tumor escape* Mechanismen

Ein weiterer Grund für den bisher moderaten Erfolg der Studien einer Immuntherapie mit  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen könnten Strategien des Tumors sein einer Immunantwort zu entkommen. Dies kann während vier verschiedener Prozesse einer Immunantwort von  $\gamma\delta$  T Zellen geschehen (zusammengefasst in Capietto et al., 2011). So kann die Infiltration von  $\gamma\delta$  T Zellen in den Tumor, deren Aktivierung oder zytotoxische Funktion sowie die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen und die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen durch unterschiedliche immunsuppressive Zellen oder Moleküle beeinflusst werden (Vgl. Abbildung 1.1). Schon die Infiltration von T Zellen in den Tumor ist vielfach gestört. Für die Infiltration von Leukozyten ins Tumorgewebe sind Chemokine sowie die Expression entsprechender Rezeptoren von großer Bedeutung. Für das PDAC konnte gezeigt werden, dass die Erkennung des Chemokins CXCL12 durch den entsprechenden Rezeptor CXCR4 von besonderer Bedeutung ist. CXCR4 wird sowohl von  $\alpha\beta$ - als auch von  $\gamma\delta$  T Zellen exprimiert (Brandes et al., 2003; Glatzel et al., 2002).  $CD8^+$  T Lymphozyten von PDAC Patienten exprimieren mehr CXCR4 als  $CD8^+$  T Zellen von gesunden Spendern und werden durch von Pankreassternzellen (pancreatic stellate cells, PSC) freigesetztes CXCL12 zur Migration zu den Pankreassternzellen angeregt (Ene-Obong et al., 2013). Hierdurch wird die Migration oder der Kontakt zu Tumorzellen erschwert (Ene-Obong et al., 2013). CXCL12 wirkt auch auf Tumorzellen selbst und fördert deren Proliferation und Invasion (Orimo et al., 2005). Dadurch könnte CXCL12 in Verbindung mit seinem Rezeptor CXCR4 zur schlechten Prognose des PDAC beitragen (Shen et al., 2013; Sleightholm et al., 2017). Werden zytotoxische Zellen durch Zytokine wie CXCL12 oder andere angelockt, adhärieren diese und wandern ins Tumorgewebe ein. Die Einwanderung von Leukozyten ins Tumorgewebe kann durch eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. Integrinen erschwert werden (Takeichi et al., 2012). Das Zytokinmilieu in der Tumorumgebung trägt u.a. zur Rekrutierung immunsuppressiver Zellen wie z.B. *mesenchymal stem cells* (MSC), *tumor associated macrophages* (TAM), *immature dendritic cells* (iDC), *mesenchymal derived suppressor cells* (MDSC) oder  $T_{reg}$  bei (Vgl. Abbildung 1.1).

MSC schützen u.a. die Tumorzellen im Ovarialkarzinom vor Apoptose durch Chemotherapeutika und fördern im Kolorektalen Karzinom die Angiogenese und das Wachstum des Tumors über die Freisetzung von IL-8 (Castells et al., 2013; Wang et al., 2015). Für das PDAC konnten MSC in einem Mausmodell nachgewiesen werden, in dem K-Ras<sup>LSL.G12D</sup> spezifisch im Pankreas exprimiert ist, womit die schrittweise Entwicklung des PDAC im Menschen nachgebildet wird (Westphalen and Olive, 2012). MSC sind in diesem Mausmodell sowohl im normalen



**Abbildung 1.1: Darstellung einiger immune escape mechanismen gegenüber einer  $\gamma\delta$  T Zell Antwort.** Die Immunantwort von  $\gamma\delta$  T Zellen gegenüber Tumoren kann auf unterschiedliche Weise und durch verschiedene Immunmodulatorische Mechanismen inhibiert werden. Wie dies im Detail geschieht ist im Text erklärt. Abbildung entnommen aus (Capietto et al., 2011).

als auch im neoplastischen Stroma lokalisiert und besitzen tumorfördernde Funktion (Mathew et al., 2016). Ob sie aber eine Rolle im Stroma des humanen PDAC spielen, bleibt bisher ungeklärt.

Neben einer Inhibition von  $\alpha\beta$  T Zellen und NK Zellen (zusammengefasst in Uccelli and de Rosbo, 2015) wurde eine inhibitorische Funktion von MSC *in vitro* auch für  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen gezeigt (Martinet et al., 2009). Dies geschieht über die Cyclooxygenase (COX)-2 abhängige Produktion von PGE2, welches von MSC freigesetzt wird und die Proliferation, Zytokinproduktion und zytotoxische Aktivität von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen über die Bindung an EP2- und EP4-Rezeptoren auf der Oberfläche der  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen inhibiert. In  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen wie auch in NK Zellen geschieht die Inhibition über die cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Martinet et al., 2010). Unsere Gruppe konnte zeigen, dass PGE2 im PDAC nicht nur durch MSC sondern insbesondere auch durch die Tumorzellen selbst freigesetzt werden kann und die zytotoxische Aktivität von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen hemmt (Gonnermann et al., 2015).

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) können einen hohen Anteil (bis zu 50%) an der gesamten Tumormasse ausmachen und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung und der Etablierung und Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Mikromilieus. In 80% der publizierten Studien besteht eine Verbindung zwischen TAM Anzahl und Dichte und schlech-

## 1 Einleitung

ter Prognose (Laoui et al., 2014). Zwar können Makrophagen auch anti-Tumor Funktionen ausüben, sie werden jedoch häufig durch Zytokine in der Tumormikroumgebung ähnlich wie T-Helferzellen vom  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Typ in M1- oder M2-Richtung polarisiert (zusammengefasst in Mantovani et al., 2004). M2-Makrophagen können z.B. die Vaskularisierung fördernde Moleküle wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) freisetzen oder mittels Freisetzung von TGF- $\beta$  oder IL-10 zum immunsuppressiven Milieu beitragen (Szebeni et al., 2017). Beim PDAC konnten tumor-assoziierte Makrophagen mit sowohl M1- (Expression von HLA-DR, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) als auch M2-Phänotyp (Expression von CD163 und IL-10) nachgewiesen werden (Helm et al., 2014a). Auch in Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis waren beide Phänotypen wie auch eine Mischform (Expression von HLA-DR und CD163) zu finden, was darauf hindeutet, dass TAM schon früh in der Tumorentwicklung des PDAC eine Rolle spielen (Helm et al., 2014b).

Auch *immature dendritic cells* (iDC) und *mesenchymal derived suppressor cells* (MDSC) sind im Tumormikromilieu vorhanden und können die Tumorantwort negativ beeinflussen. iDC in der Tumorumgebung zeigen z.B. eine geringe Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und können Antigene nicht gut präsentieren, wodurch eine effektive Immunantwort von  $\alpha\beta$  T Zellen nicht stattfinden kann (Gabrilovich, 2004). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Reaktion von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen auf Phosphoantigene von iDC verstärkt werden und diese *vice versa* iDC zur Maturierung anregen (Devilder et al., 2006).

$T_{reg}$  und andere immunsuppressive Zellen könnten zum einen zum Tumor wandern oder durch vom Tumor oder der Tumorumgebung freigesetzte Zytokine in eine immunsuppressive Richtung differenziert werden. Die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) könnte mit verantwortlich sein für die Differenzierung von T Zellen in eine immunsuppressive Richtung. IDO wird von vielen Tumoren überexprimiert und wird beim PDAC insbesondere nach IFN- $\gamma$ -Stimulation hochreguliert (Doktorarbeit von Hannah Jonescheit in der AG Wesch/Oberg). IDO katalysiert den Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin, welches die Differenzierung von naiven  $CD4^+$  T Zellen in regulatorische T Zellen induzieren kann (Chen et al., 2008). Auch weitere potentiell immunsuppressive Moleküle wie z.B. lösliche NKG2D-Liganden finden sich im immunsuppressiven Stroma von Tumoren. MIC-A/B können z.B. von der Zelloberfläche von Tumorzellen von z.B. Metalloproteasen durch *shedding* freigesetzt werden (Chitadze et al., 2013). Dies führt nicht nur dazu, dass die Tumorzellen durch NK Zellen oder  $\gamma\delta$  T Zellen nicht mehr über NKG2D erkannt werden können. Zusätzlich vermindern lösliche NKG2D-Liganden, die auch im Serum von PDAC Patienten zu finden sind, die zytotoxische Aktivität von z.B.  $\gamma\delta$  T Zellen (Märten et al., 2006). Weiterhin können Tumorzellen über die Expression verschiede-

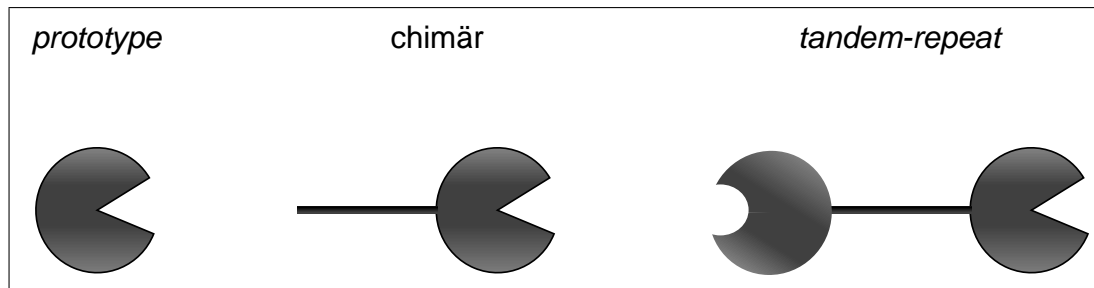
ner Moleküle wie z.B. des Immuncheckpoint-Moleküls PD-L1 eine Immunantwort modulieren (Marcucci et al., 2017). Auch die Herunterregulation verschiedener Moleküle kann eine Rolle spielen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Interaktion von T Zellen mit Tumorzellen über ICAM-1 (CD54) besonders wichtig für die zytotoxische Aktivität von  $\gamma\delta$  T Zellen ist (Liu et al., 2009; Shojaei et al., 2009). Auch die Expression von Zucker-bindenden Molekülen wie den Galektinen könnte eine Rolle in der Tumor-vermittelten Suppression einer Immunantwort durch T Zellen spielen.  $T_{reg}$ , die ebenfalls im immunsuppressiven Stroma vieler Tumore zu finden sind, können Proliferation und Zytokinproduktion von zytotoxischen T Zellen hemmen. Dies kann über zellkontaktabhängige Mechanismen passieren (n $T_{reg}$  (Piccirillo and Shevach, 2001)), allerdings könnten auch die von i $T_{reg}$  freigesetzten immunsuppressiven Zytokine wie TGF- $\beta$  oder IL-10 zur Immunsuppression beitragen (Tang and Bluestone, 2008).

## 1.4 Galektine

Galektine sind eine Gruppe von Proteinen, die  $\beta$ -Galaktosid-Zuckerstrukturen erkennen können. Diese werden z.B. bei der N- oder O-Glykosylierung von Proteinen verwendet, wodurch Galektine eine große Anzahl verschiedener Proteine binden können. Die Erkennung und Bindung durch Galektine erfolgt durch die Kohlenhydraterkennungsdomäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD). Es sind bisher 15 Galektine beschrieben, die anhand der Anzahl und Struktur der CRD in *prototype* Galektine, chimäre Galektine und *tandem-repeat* Galektine unterteilt werden (Vgl. Abbildung 1.2). Die *prototype* Galektine Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15 bestehen aus einer CRD, die dimerisieren kann. Galektin-3, das einzige Mitglied der Gruppe der chimären Galektine, besteht aus einer CRD mit einer N-terminalen Domäne über die Galektin-3 Pentamere bilden kann. Ein Mitglied der Familie der *tandem-repeat* Galektine ist neben Galektin-4, -6, -8 und -12 auch Galektin-9. Diese Galektine zeichnen sich durch zwei CRDs aus, die über einen flexiblen Peptidlinker verbunden sind (Méndez-Huergo et al., 2017). Im Menschen sind bisher Galektin-1-4, -7-10 sowie -12 und -13 gefunden worden, wohingegen Galektin-5 und -6 in Nagetieren und Galektin-11, -14 und -15 in Schaf und Ziege beschrieben wurden (Ebrahim et al., 2014). Nicht nur die CRD ist für die Bindung von Galektinen an andere Proteine verantwortlich. Galektin-9 z.B. wird in verschiedenen Geweben mit unterschiedlich langen Peptidlinkern exprimiert und besitzt davon abhängig unterschiedliche Eigenschaften (Sato et al., 2002a; Spitzenberger et al., 2001).

Galektine werden im Zytoplasma an freien Ribosomen synthetisiert (Wilson et al., 1989), von wo aus sie z.B. auch in den Nukleus gelangen können. Dort sind z.B. Galektin-1 und Galektin-3

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.2: Galektine werden in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt.** *Prototype* Galektine bestehen aus einer Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD), die dimerisieren kann. Im Gegensatz dazu besteht das einzige bisher bekannte Galektin des chimären Typs (Galektin-3) aus einer CRD mit einem Peptidlinker, über den es Pentamere bilden kann. *Tandem-repeat* Galektine bestehen aus zwei CRDs, die über einen flexiblen Peptidlinker verbunden sind. Auch *tandem-repeat* Galektine können multimerisieren.

wichtig für das *splicen* von RNA (Dagher et al., 1995; Vyakarnam et al., 1997). Aufgrund ihrer Bindungsfähigkeit für glykosylierte Proteine können Galektine auch als „Klebstoff“ der Zelle bezeichnet werden. Durch ihre Fähigkeit zu multimerisieren oder durch die bei *tandem-repeat* Galektinen vorhandenen zwei CRDs können sie z.B. Zell-Zell-Kontakte etablieren oder Netzwerke bilden und sind häufig ein Teil der extrazellulären Matrix (Ochieng et al., 1998b). Wie Galektine von Zellen freigesetzt werden, ist allerdings bisher ungeklärt. Da Galektine keine klassische Signalsequenz besitzen, werden sie nicht über den klassischen sekretorischen Weg freigesetzt. Stattdessen werden nicht-klassische Wege der Freisetzung für Galektine wie z.B. die Translokation durch Membrantransporter diskutiert (zusammengefasst in Hughes, 1999). Das am Besten untersuchte Galektin ist neben Galektin-1 insbesondere Galektin-3 (Ebrahim et al., 2014).

Galektin-3, das ein berechnetes Molekulargewicht von 26kDa besitzt, unterscheidet sich strukturell von anderen Galektinen. Es besitzt eine N-terminale Domäne sowie die C-terminale CRD. Die N-terminale Domäne ist essentiell für die volle biologische Aktivität und ist notwendig für die Bildung von Pentameren (Ahmad et al., 2004). Die CRD ist verantwortlich für die Bindung von Galektin-3 an N-Acetyl-Laktosamin an Kohlenhydratketten von glykosylierten Proteinen, wohingegen einige Protein-Protein-Interaktionen auch unabhängig von Kohlenhydraten vermittelt werden (Menon et al., 2000).

Galektin-3 wird in vielen Zellpopulationen exprimiert. Je nach Zellpopulation und Status der Zelle ist Galektin-3 im Nukleus, im Zytoplasma oder auf der Zelloberfläche exprimiert. Auch eine Freisetzung von Galektin-3 ist beschrieben (Radosavljevic et al., 2012). Extrazelluläres Galektin-3 sorgt für eine Quervernetzung von Zellen mit der extrazellulären Matrix oder von benachbarten Zellen (Dumic et al., 2006). Im Zytoplasma besitzt Galektin-3 antiapoptotische Wirkung, welche u.a. über die Interaktion mit Bcl-2 vermittelt wird (Yang et al., 1996). Au-



Berdem ist zytoplasmatisches Galektin-3 über Bindung an K-Ras oder Akt an vielen weiteren Prozessen wie Zellproliferation oder Zelldifferenzierung beteiligt (Oka et al., 2005; Shalom-Feuerstein et al., 2005). Obwohl Galektin-3 keine *nuclear localization sequence* (NLS) besitzt, ist Galektin-3 Expression im Nukleus beschrieben. Dort fungiert Galektin-3 im Gegensatz zu zytoplasmatischem Galektin-3 als pro-apoptisches Protein und ist an der Prozessierung von pre-mRNAs beteiligt (Califice et al., 2004; Patterson et al., 2002). Auch Zellen des Immunsystems exprimieren Galektin-3. In Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten ist Galektin-3 an der IgE-abhängigen Aktivierung beteiligt (Truong et al., 1993a,b). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Funktion von Galektin-3 in einem Ovalbumin-induzierten Asthma Mausmodell untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 Knockout Mäuse deutlich weniger Hyperreaktivität gegenüber induziertem Asthma aufweisen als Wildtyp Mäuse, was darauf hindeutet, dass Galektin-3 eine entscheidende Rolle in der Entzündung der Atemwege spielt (Zuberi et al., 2004). Mechanistisch könnte hierbei besonders die Adhäsion von Neutrophilen und Eosinophilen an Epithelzellen oder deren Migration eine Rolle spielen. An beiden Prozessen ist Galektin-3 beteiligt (Rao et al., 2007; Sato et al., 2002b). Zusätzlich wurde Galektin-3 in Mastzellen und Basophilen Granulozyten in sekretorischen Granula gefunden was darauf hindeutet, dass Galektin-3 möglicherweise an der Freisetzung von sekretorischen Granula beteiligt ist (Craig et al., 1995). Galektin-3 ist in Mastzellen ebenfalls an der IgE-vermittelten Antwort beteiligt und der Knockout führt zu einer verminderten Histaminfreisetzung und verringerter IL-4 Produktion (Chen et al., 2006).

Auch für Monozyten ist eine Expression von Galektin-3 beschrieben. Diese erhöht sich um Faktor 5 bzw. Faktor 11, wenn Monozyten für 2 bzw. 5 Tage in Richtung Makrophagen differenziert werden (Liu et al., 1995). In Makrophagen vermittelt Galektin-3 durch Bindung an CD98 an der Oberfläche die Aktivierung eines alternativen (M2) Phänotyps über IL-4 und IL-13. Zusätzlich erhöht IL-4 die Galektin-3 Expression und Freisetzung was zu einer autokrinen Verstärkung dieser alternativen Aktivierung führt (MacKinnon et al., 2008). Ferner dient Galektin-3 als Botenstoff für die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten (Sano et al., 2000) und vermittelt die Erkennung des Pilzes *Candida albicans* durch Makrophagen (Jouault et al., 2006). Diese unterschiedlichen Galektin-3-vermittelten Prozesse der Makrophagen sind stark vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig (Sano et al., 2003).

Auch an der adaptiven Immunantwort ist Galektin-3 beteiligt. Im Thymus z.B. ist Galektin-3 beteiligt an der Regulation der Thymozyten-Selektion sowie der Thymozyten-Migration (Silva-Monteiro et al., 2007). In murinen Lymphozyten selbst ist Galektin-3 hingegen nur sehr gering exprimiert, wird allerdings in T Zellen nach Aktivierung über CD3 oder durch Conca-

## 1 Einleitung

navalin A hochreguliert. Dabei konnte Galektin-3 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert werden, wohingegen in murinen T Zellen keine Oberflächenexpression beschrieben ist (Joo et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnten Demotte und Kollegen Galektin-3 auf der Oberfläche von humanen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten nachweisen (Demotte et al., 2010). In Leukämie-Zelllinien verringerte die Inhibition von Galektin-3 in T Zellen durch *antisense* Oligonukleotide die Proliferation, hatte aber keinen Einfluss auf den Zelltod von T Zellen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Jurkat T Zellen, die mit Galektin-3 transfiziert wurden, deutlich resistenter gegenüber der Induktion von Apoptose durch Protein-Kinase-Inhibitoren sind als Galektin-3 negative Kontrollen (Yang et al., 1996). Fukumori und Kollegen konnten zeigen, dass Galektin-3 Zelltod sowohl in MOLT-4 und Jurkat T Zellen als auch in humanen PBMZ induziert, was in MOLT-4 Zellen über Bindung an CD7 und CD29 vermittelt wird (Fukumori et al., 2003). Stillman und Kollegen konnten dagegen CD45 und CD71 identifizieren, über die Galektin-3 ebenfalls Zelltod in Jurkat- und CEM-T Zellen induziert (Stillman et al., 2006). Grundsätzlich scheint der Effekt von Galektin-3 im adaptiven Immunsystem eher immunsuppressiv zu sein. Galektin-3 hat z.B. einen negativen Effekt auf das TZR *signaling* in murinen CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen, indem es die immunologische Synapse destabilisiert und die Herunterregulation des TZR fördert (Chen et al., 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 in tumorinfiltrierenden Lymphozyten dafür verantwortlich ist, dass der TZR nicht mehr mit CD8 kolokalisiert, wodurch Anergie induziert wird (Demotte et al., 2008). Kouo und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass Galektin-3 an das Immun-Checkpoint Molekül *lymphocyte activation gene* (LAG)-3 bindet und über diese Bindung die anti-Tumor-Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T Zellen supprimiert (Kouo et al., 2015). Auch Peng und Kollegen konnten zeigen, dass Galektin-3 Apoptose in tumorreaktiven CD8<sup>+</sup> T Zellen induziert. Zusätzlich steigerte eine hohe Expression von Galektin-3 in einem Mausmodell für das kolorektale Karzinom das Tumorwachstum (Peng et al., 2008). Auch in Biopsien aus Primärtumoren und Metastasen von Melanompatienten korrelierte die Galektin-3 Expression mit der Apoptose von Tumor-assoziierten Lymphozyten (Zubieta et al., 2006). Wurden TIL mit GCS-100, einem modifizierten Zitruspektin, das Galektin-3 inhibiert, behandelt, wiesen sie weniger Galektin-3 auf der Zelloberfläche auf und zeigten eine deutlich erhöhte IFN- $\gamma$  Freisetzung (Demotte et al., 2010).

Insgesamt deuten die publizierten Daten darauf hin, dass Galektin-3 eine wichtige Rolle in der Suppression einer  $\alpha\beta$  T Zell-Antwort im Tumorgeschehen spielt. Es ist bisher allerdings nicht untersucht wie Galektin-3 auf  $\gamma\delta$  T Zellen wirkt bzw. ob Galektin-3 auch die Immunantwort von  $\gamma\delta$  T Zellen moduliert.

Galektin-3 ist in vielen verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert (zusammengefasst in

Thijssen et al., 2015). Häufig erhalten unterschiedliche Studien allerdings unterschiedliche Ergebnisse, wenn die Expression im Tumor mit Normalgewebe verglichen wird. Das Problem hierbei sind zu Teilen unterschiedliche experimentelle Herangehensweisen, die z.B. keinen Vergleich der nukleären und zytoplasmatischen Expression ermöglichen und somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren. Während z.B. Kim und Kollegen beim Ovarialkarzinom eine Überexpression von Galektin-3 im Tumor im Vergleich zu Normalgewebe feststellten, konnte in anderen Studien eine verminderte Expression von Galektin-3 im Tumor von Ovarialkarzinompatientinnen gezeigt werden (Brustmann, 2008; Cortesi et al., 2011; Kim et al., 2011). Zusätzlich wird Galektin-3 durch die Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 9 gespalten und freigesetzt (Ochieng et al., 1994). Dies ist z.B. für das Prostatakarzinom beschrieben und korreliert mit der Progression von Brustkrebs (Nangia-Makker et al., 2007; Wang et al., 2009). Galektin-3 könnte somit im Serum ein prognostischer Marker sein, der auch schon in einigen Tumorentitäten untersucht wurde (Thijssen et al., 2015). Funktionell ist Galektin-3 im Tumorgeschehen meist mit negativen Faktoren assoziiert. Die Überexpression von Galektin-3 in Brustkrebs Zellen führte z.B. zu einer Verstärkung der Adhäsion der Zellen an Laminin, Fibronectin und Vitronectin sowie zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose (Matarrese et al., 2000). Im Gegensatz dazu führte eine Inhibition von Galektin-3 dazu, dass Brustkrebszellen *in vitro* ihren malignen Phänotyp verloren. Auch *in vivo* führte eine Herunterregulation von Galektin-3 in MDA-MB-435 Zellen nach Transfer in athymische Mäuse zu deutlich reduziertem Tumorwachstum (Honjo et al., 2001). Galectin Therapeutics, eine Firma, die Galektin-3 Inhibitoren entwickelt, hat das Lipopolysaccharid GR-MD-02, welches ein weiterer Galektin-3 Inhibitor ist, in einem Fibrose-Rattenmodell und in mehreren klinischen Studien untersucht. Neben ersten Phase I und Phase II Studien bei der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) wurde GR-MD-02 auch in ersten Phase I Studien für eine Kombinationstherapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (Ipilimumab, Pembrolizumab) und Galektin-3 Inhibitor getestet, wobei sich erste vielversprechende Resultate einer (zusätzlichen) Galektin-3 Inhibition zeigten (Harrison et al., 2016; Traber et al., 2013).

Durch die vielfältigen Möglichkeiten Adhäsion von Zellen zu regulieren und an Proteine der extrazellulären Matrix zu binden, spielt Galektin-3 auch eine große Rolle bei der Metastasierung (zusammengefasst in Funasaka et al., 2014; Takenaka et al., 2002). Aber auch hier gibt es Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorentitäten. Während Galektin-3 in Ovarialkarzinomzellen zu einer vermehrten Migration der Tumorzellen beiträgt, korreliert bei PDAC Patienten eine verringerte Galektin-3 Expression mit vermehrten Metastasen (Lu et al., 2016; Shimamura et al., 2002). Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Herunterregulation von Galektin-3 in PDAC Zellen die Fähigkeit der PDAC Zellen zu migrieren über einen

## 1 Einleitung

Mechanismus, der MMP-2, die Proteinkinase Akt, Glykogensynthase-Kinase (GSK)-3 und  $\beta$ -Catenin beinhaltet, verringert (Kobayashi et al., 2011b).

Neben der Beeinflussung der Migration von PDAC Zellen spielt Galektin-3 auch eine Rolle bei der Initiierung von PDAC. In Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis, die auch als Vorläuferläsion für das PDAC vermutet wird, ist Galektin-3 im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe verstärkt exprimiert, was darauf hindeutet, dass Galektin-3 schon früh in der Entwicklung des PDAC eine Rolle spielt (Wang et al., 2000). Insbesondere die Expression in Gangepithelzellen und in den Azinuszellen könnte dazu beitragen, dass sich eine chronische Pankreatitis zu einem PDAC entwickelt. Galektin-3 bindet an K-Ras, welches in nahezu allen PDAC Tumoren mutiert ist (Elad-Sfadia et al., 2004). In PDAC Zellen wird durch Bindung von Galektin-3 an Ras der Ras-Signalweg ausgelöst, was zu verstärkter Proliferation und invasiver Kapazität führt (Song et al., 2012). Eine Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zelllinien ist ebenfalls beschrieben (Gaida et al., 2012). Ob das von PDAC Zellen freigesetzte Galektin-3 auf T Zellen wirkt, ist allerdings unklar. Ob eine Freisetzung von Galektin-3 in PDAC Zellen oder auch T Zellen induziert werden kann und ob sich die Freisetzung in Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen verändert, wurde bisher nicht untersucht.

## 1.5 Fragestellung

Die Arbeitsgruppe Wesch konnte in Kooperation mit der AG Sebens eine Infiltration von  $\gamma\delta$  T Zellen in PDAC Tumore nachweisen. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass  $\gamma\delta$  T Zellen selektiv über ihre Antigene und IL-2 aktiviert werden müssen um PDAC Zellen lysieren zu können. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Resistenzmechanismen gibt, die eine Lyse von PDAC Zellen durch  $\gamma\delta$  T Zellen verhindern. Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass Galektin-3 in der Interaktion von T Zellen mit PDAC Zellen eine besondere Rolle einnimmt. Die Funktion von Galektin-3 in dieser Interaktion sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert werden. Hierbei wurde ein besonderer Fokus auf folgende Fragestellungen gelegt:

1. Wird Galektin-3 von PDAC Zellen bzw. Ovarialkarzinomzellen freigesetzt und wird die Freisetzung in Kokultur mit T Zellen, insbesondere den  $\gamma\delta$  T Zellen moduliert?
2. Wird Galektin-3 von T Zellen freigesetzt und dient nach deren Aktivierung möglicherweise als zytotoxischer Mediator?
3. Welche Effekte hat Galektin-3 auf ( $\gamma\delta$ ) T Zellen und Tumorzellen und wie werden diese vermittelt?
4. Infiltrieren  $\gamma\delta$  T Zellen und  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T Zellen ebenfalls in Ovarialkarzinome, die wie PDAC Tumore eine immunsuppressive Tumormikroumgebung aufweisen?
5. Welche T Zellsubpopulationen sind im Aszites und Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen zu detektieren?
6. Spielt Galektin-3 in der Interaktion von T Zellen und frisch isolierten primären Ovarialkarzinom Zellen eine Rolle?



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Geräte

**Tabelle 2.1:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Firma
$\beta$ -Szintillationszähler	MicroBeta Trilux	PerkinElmer, Boston, USA
Blotkammer	<i>Wet/Tank blotting system</i>	Biorad, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heracell 240	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
	Imagestream <sup>X</sup> MKII	MerckMillipore, Darmstadt
	LSRFortessa	BD Biosciences
Elektrophoresekammer	Minigel	Biometra, Göttingen
ELISA Reader	Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Entwicklermaschine		Agfa, Gera
JuLi Br		NanoEnTek, Seoul, Korea
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Göttingen
	Axiovert 10	Zeiss
Pipetten	0,1-1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
	Multikanal 5-300 $\mu$ l	Thermo Fisher Scientific
Pipettor	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
RTCA	Single plate (SP) assay	Roche, Mannheim
Spektrophotometer	Smartspec3000	Biorad
Sterilwerkbank	Lamin Air HB 2472 K	Thermo Fisher Scientific
Zählkammer	Neubauer	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Megafuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific
	Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific

## 2.2 Materialien

**Tabelle 2.2:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
6er Platte	Greiner, Frickenhausen
12er Platte	Greiner
24er Platte	Greiner
96er Platte, Flachboden	Thermo Fisher Scientific
96er Platte, Rundboden	Thermo Fisher Scientific
96er Platte, Spitzboden	Nerbe, Winsen/Luhe
96er Platte, Maxisorp	Thermo Fisher Scientific
96er E-Platte	ACEA, San Diego, USA
Amersham <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> Detection Reagents	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL	GE Healthcare
Filterpapier Whatman	GE Healthcare
FACS-Röhrchen, 0,6 ml	Thermo Fisher Scientific
MACS-LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrozellulosemembran	Machery Nagel, Düren
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Sarstedt
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 1-50 ml	Greiner
Transwell-Einsatz, 0,4 $\mu$ m Porengröße	Greiner
Zellkulturflaschen, 50 ml, 250 ml, 650 ml	Greiner
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien oder Reagenzien waren von Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen.

**Tabelle 2.3:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma
Complete Proteaseinhibitor	Roche
<sup>51</sup> Chrom (Aktivität 1mCi)	PerkinElmer, Billerica, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem, Darmstadt
ECL Plus	GE Healthcare
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Eosin	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fötiales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Karlsruhe



Name	Firma
Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin
Glycin	Roth
L-Glutamin	Biochrom
Methanol	Roth
Milchpulver	Frema Granovita, Heimertingen
Monensin	Merck
NaCl	Merck
NaF	Merck
NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Propidiumiodid	Serva
Rinder Serum Albumin (BSA)	Serva
RPMI 1640	Life Technologies
TMB Substrat	Thermo Fisher Scientific
Tris	Roth
Triton X-100	Merck
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma-Aldrich

## 2.3 Medien und Puffer

**Tabelle 2.4:** Verwendete Medien, Puffer und Lösungen. Für alle Substanzen ist jeweils die Endkonzentration angegeben.

Name	Substanz
Eosin-Lösung zur Zellzählung	2 g Eosin 0,25 g NaN <sub>3</sub> 450 ml NaCl-Lösung (0,9 %) 50 ml FKS

## 2 Materialien und Methoden

Name	Substanz
Einfriermedium	RPMI 1640 20 % FKS 10 % DMSO
FACS PFA-Lösung	PBS 0,1 % (w/v) PFA
FACS <i>staining buffer</i>	PBS 1 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub>
FACS Waschpuffer	PBS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub> 1 % (w/v) BSA
MACS Waschpuffer	PBS 0,5 % (w/v) BSA 2 mM EDTA
PBS-T	PBS 0,1 % (v/v) Tween 20
SDS Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
SDS Probenpuffer	125 mM Tris pH 6.8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,0025 % (w/v) Bromophenolblau 8 % $\beta$ -Mercaptoethanol

---

Name	Substanz
<i>Stripping</i> -Lösung	62,5 mM Tris 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 2 % (v/v) SDS
TBS-T	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
TNE Lysepuffer (Tris, NP-40, EDTA Lysepuffer)	50 mM Tris 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 2 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 4 % (v/v) Complete™
Transblot Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 25 % (v/v) Methanol
Trypsin/EDTA	0,05 % (w/v) Trypsin 0,02 % (w/v) EDTA PBS
Zellkulturmedium	RPMI 1640 25 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 10 % FKS

## 2.4 Stimulanzen und Zusätze

**Tabelle 2.5:** Verwendete Reagenzien und Zusätze. r: rekombinant, h: human

Name	Einsatzkonzentration	Herkunft
Bromohydrin-Pyrophosphat (BrHPP)	300 nM	Innate Pharma, Marseille, Frankreich
[HER2xCD3]	1 µg/ml	Prof. Peipp/PD Dr. Kellner
[(HER2) <sub>2</sub> xVγ9]	1 µg/ml	Prof. Peipp/PD Dr. Kellner
Ionomycin	500 ng/ml	Calbiochem
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	10-100 ng/ml	Sigma-Aldrich
rhIL-2	12,5-50 IU/ml	Novartis, Basel, Schweiz
Zoledronat	2,5 µM	Novartis

## 2.5 Testsysteme

**Tabelle 2.6:** Verwendete Testsysteme und Fertiglösungen

Name	Katalognummer	Firma
Annexin-V-FITC	AnxF100	MabTag GmbH, Friesoythe
Annexin-V binding buffer	AnxBuff	MabTag GmbH
Anti-TCRγδ MicroBead Kit	130-050-701	Miltenyi Biotec
CD4 MicroBeads	130-045-101	Miltenyi Biotec
CD8 MicroBeads	130-045-201	Miltenyi Biotec
Coomassie Protein Assay Reagent	23236	Thermo Fisher
Cytofix/Cytoperm	554714	BD Biosciences
FcR Blocking Reagent	130-059-901	Miltenyi Biotec
Human Galectin-3 DuoSet ELISA	DY1154	R&D Systems, Wiesbaden
Human Galectin-9 DuoSet ELISA	DY2045	R&D Systems
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (10 Wells)	NP0321	Thermo Fisher
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (15 Wells)	NP0336	Thermo Fisher
Proteinmarker „Precision Plus“	161-0373	Biorad
T Cell Activation/Expansion Kit	130-091-441	Miltenyi Biotec

## 2.6 Antikörper

**Tabelle 2.7:** Antikörper für die Oberflächenfärbung. Im Falle unbekannter Ausgangskonzentration wurde die Verdünnung angegeben. AF:AlexaFluor, BV: BrilliantViolet

Antigen	Fluorochrom	Klon	Endkonzentration	Firma
CD2	Biotin	OKT11	30 $\mu\text{g/ml}$	Hybridom, ATCC
CD3	Biotin	OKT3	50 $\mu\text{g/ml}$	Hybridom, ATCC
CD3	AF647	SK7	5 $\mu\text{g/ml}$	Biologend, San Diego, USA
CD3	PE	SK7	2,5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD3	BV421	UCHT1	5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD4	Biotin	OKT4	20 $\mu\text{g/ml}$	Hybridom, ATCC
CD4	PE	SK3	0,6 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD8	PE	SK1	2,5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD8	APC	BW135/80	1:10	Miltenyi Biotec
CD107a	PE	H4A3	10 $\mu\text{g/ml}$	BioLegend
CD326	APC	HEA-125	0,55 $\mu\text{g/ml}$	Miltenyi Biotec
MHC I	Biotin	W6/32	50 $\mu\text{g/ml}$	Hybridom, ATCC
TCR $\alpha\beta$	Biotin	BMA031	50 $\mu\text{g/ml}$	Immunotech, Monrovia, USA
TCR $\alpha\beta$	FITC	IP26	100 $\mu\text{g/ml}$	Biologend
TCR $\gamma\delta$	FITC	11F2	17 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
TCR $\gamma\delta$	PE	11F2	25 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
V $\delta$ 1	FITC	TS8.2	30 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
V $\delta$ 2	FITC	IMMU389	1:4	Beckmann&Coulter
V $\gamma$ 9	AF488	7A5	5-20 $\mu\text{g/ml}$	eigenes Labor
V $\gamma$ 9	FITC	7A5	5-20 $\mu\text{g/ml}$	eigenes Labor
IgG1 (Maus)	AF647	MOPC-21	entsprechend	Biologend
IgG1 (Maus)	FITC	X40	entsprechend	BD Biosciences
IgG1 (Maus)	PE	X40	entsprechend	BD Biosciences

## 2 Materialien und Methoden

**Tabelle 2.8:** Antikörper für die intrazelluläre Färbung. AF:AlexaFluor

Antigen	Fluorochrom	Klon	Endkonzentration	Firma
CD63	PE	MEM-259	250 $\mu\text{g/ml}$	Abcam, Cambridge, VK
CD107a/LAMP-1	PE	H4A3	1,2 $\mu\text{g/ml}$	BioLegend
Galektin-3	AF647	M3/38	1 $\mu\text{g/ml}$	BioLegend
Galektin-3	—	M3/38	1-10 $\mu\text{g/ml}$	BioLegend
Galektin-3	—	Gal397	1-10 $\mu\text{g/ml}$	BioLegend
Rab11	—	polyklonal	1 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
Vti1b	—	7/Vti1b	5 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences

**Tabelle 2.9:** Sekundärantikörper. Im Falle unbekannter Ausgangskonzentration wurde die Verdünnung angegeben. AF:AlexaFluor

Name	Fluorochrom	Endkonzentration	Firma
Esel-anti-Kaninchen	AF555	10 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
Esel-anti-Maus	AF555	10 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
Huhn-anti-Ratte	AF488	10 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
Streptavidin	APC	100 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
Ziege-anti-Maus	Biotin	100 $\mu\text{g/ml}$	Jackson, Cambridgeshire, VK
Ziege-anti-Maus	HRP	1:7500	GE Healthcare
Ziege-anti-Ratte	AF555	10 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher
Ziege-anti-Ratte	HRP	1:5000	GE Healthcare

**Tabelle 2.10:** Für WesternBlot verwendete Antikörper. Im Falle unbekannter Ausgangskonzentration wurde die Verdünnung angegeben.

Antigen	Klon	Endkonzentration	Firma
Galektin-3	Gal397	1 $\mu\text{g/ml}$	BioLegend
$\beta$ -Aktin	AC-15	1:10000	Sigma-Aldrich
GAPDH	6C5	1:3000	Santa Cruz, Dallas, USA

**Tabelle 2.11:** Antikörper für funktionelle Untersuchungen. m: Maus, r:Ratte

Antigen	Klon	Endkonzentration	Firma
CD7	M-T701	5-20 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD11a	HI111	5-20 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD29	Mab 13	5-20 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD45	HI30	5-20 $\mu\text{g/ml}$	Biolegend
CD49c	C3 II.1	5-20 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
mIgG1	MOPC-21	entsprechend	Biolegend
rIgG2a	RTK2758	entsprechend	Biolegend

## 2.7 siRNA

Die verwendete Stealth RNAi<sup>TM</sup> siRNA zur Herunterregulation von Galektin-3 wurde von Invitrogen, ThermoFisherScientific, Paisley, Vereinigtes Königreich, bezogen. Als Negativkontrolle wurde die Stealth RNAi<sup>TM</sup> siRNA negative control lo GC (Katalognummer: 12935200) von Invitrogen, ThermoFisherScientific, Karlsruhe verwendet.

**Tabelle 2.12:** Sequenz der verwendeten siRNA

Katalognummer	Ziel	Sequenz (5' - 3')
10620318	Galektin-3 sense	GCU GGG CCA CUG AUU GUG CCU UAU A
10620319	Galektin-3 antisense	UAU AAG GCA CAA UCA GUG GCC CAG C

## 2.8 Patientinnen

Blut, Aszites und Gewebe von 21 Patientinnen mit serösem oder muzinösem Ovarialkarzinom wurde uns durch Prof. Bauerschlag aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH, Kiel zur Verfügung gestellt. Alle Patientinnen hatten vorher ihr Einverständnis zur Spende erteilt, welche auch durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt ist (AZ B3277/10).

**Tabelle 2.13:** Kollektiv der Patientinnen mit serösem oder muzinösem Ovarialkarzinom

Parameter	Anzahl
Patientinnen (Alter 55± 11)	21
Blut	20
Aszites	14
Tumor	13
<b>FIGO-Klassifikation</b>	<b>Anzahl</b>
IA	2
IB	1
IIIB	2
IIIC	13
IV	3

## 2.9 Zelllinien

Alle PDAC Zelllinien wurden uns durch Prof. Kalthoff/Sebens und Dr. Röder zur Verfügung gestellt, die Ovarialkarzinom Zelllinien wurden über die *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen und stammen aus dem Labor von Prof. Bauerschlag. Der Genotyp und die Freiheit von Mykoplasmen wurde regelmäßig durch *short tandem repeat* (STR) Analyse bzw. Mykoplasmentest überprüft.

**Tabelle 2.14:** Alle PDAC Zelllinien wie beschrieben in Sipos et al. (2003). Beide Ovarialkarzinom Zelllinien wie beschrieben in Buick et al. (1985).

Zelllinie	Quelle der Tumorzelle	Histologie
BxPC-3	Primärer Tumor	PDAC
Capan-1	Lebermetastase	PDAC
Capan-2	Primärer Tumor	PDAC
Colo357	Lymphknotenmetastase	PDAC
MiaPaCa-2	Primärer Tumor	PDAC
Panc1	Primärer Tumor	PDAC
Panc89	Lymphknotenmetastase	PDAC
PancTu-I	Primärer Tumor	PDAC
HEY	Tumor Xenograft	Ovarialkarzinom
SKOV3	Aszites	Ovarialkarzinom

## 2.10 Software

**Tabelle 2.15:** Verwendete Software

Software	Firma
Cell Quest Pro	BD Biosciences
FACS Diva 8	BD Biosciences
FlowJo V10	FlowJo LLC
Graphpad Prism 6	Graphpad Software, Inc.
IDEAS	MerckMillipore
INSPIRE	MerckMillipore
Microsoft Office	Microsoft
RTCA Software	ACEA Biosciences, Inc.



## 2.11 Statistik

Die Daten wurden mit einem ein-oder zweiseitigen Studentischen T Test oder mit einem zweiseitigen Mann-Whitney U Test mittels Microsoft Excel oder GraphPad Prism auf statistische Signifikanz überprüft.

## 2.12 Zellbiologische Methoden

### 2.12.1 Kultivierung von Zellen

Sowohl etablierte Tumorzelllinien als auch T Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin verwendet (Zellkulturmedium). Jede neue Charge FKS wurde im Labor auf seine Eignung für die Zellkultur der besonders empfindlichen  $\gamma\delta$  T Zellen in Proliferationstests untersucht. Adhärenz Tumorzelllinien wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und zur Entfernung restlicher Mediumbestandteile mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun mit Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert und abgelöst. Die Zellen wurden anschließend zur Entfernung des Trypsin/EDTA zentrifugiert (317 g, 5 Minuten), mit PBS gewaschen, gezählt und in Zellkulturmedium in der benötigten Zellzahl erneut ausgesät. Wurden Tumorzellen für einen Versuch benötigt, wurden diese vorher in einer frischen Zellkulturflasche ausgesät.

### 2.12.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können zur Aufbewahrung kryokonserviert werden. Hierfür wurden die gewünschten Zellen pellettiert (317 g, 5 Minuten), in Einfriermedium aufgenommen (maximal  $35-40 \times 10^6$ ) und in gekühlte Kryoröhrchen überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert die Bildung von Kristallen und schützt so die Integrität der Zellmembran. Die Kryoröhrchen wurden zunächst für ca. 20 Minuten bei -20°C und dann bei -80°C eingefroren und nach wenigen Tagen in flüssigem Stickstoff konserviert. Zum Auftauen wurden die Zellen möglichst

## 2 Materialien und Methoden

schnell ins kalte Zellkulturmedium überführt mehrmals gewaschen um das schon bei Raumtemperatur toxische DMSO möglichst schnell zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend gezählt und in Kultur genommen.

### 2.12.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Periphere mononukleäre Zellen (PBMZ) wurden entweder aus Vollblut oder aus Leukozytenkonzentraten von gesunden Blutspendern oder aus Vollblut von Patienten gewonnen. Leukozytenkonzentrate von den für uns anonymisierten Blutspendern wurden uns freundlicherweise durch das Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der Blutspende oder der Leukozytenkonzentrate für die Forschung ist durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (Codenummer: D403/14, D404/14, D405/10, B3277/10). Zur Generierung von PBMZ wurde das Vollblut mit dem gleichen Volumen PBS, das Leukozytenkonzentrat im Verhältnis 1:10 verdünnt auf Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Durch die anschließende Zentrifugation mit 751 g für 20 Minuten ohne Bremse wurden die Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte aufgetrennt, wobei sich das Plasma und Thrombozyten im Überstand ansammeln. Der Interphasering enthält Lymphozyten und Monozyten, wohingegen die Erythrozyten und Granulozyten pelletiert werden. Der Interphasering wurde entnommen und für 5 Minuten bei 481 g mit PBS gewaschen. Zur Entfernung von Thrombozyten und Ficollrückständen wurde noch weitere zwei Mal für 10 Minuten bei 188 g mit PBS gewaschen. Die auf diese Weise gewonnenen PBMZ wurden anschließend in Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt.

### 2.12.4 Isolation von Tumor-Aszites-Lymphozyten

Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurde entweder vor oder während der Operation entnommen und wurde uns von Prof. Dirk Bauerschlag aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH, Kiel zur Verfügung gestellt. Um Tumor-Aszites-Lymphozyten (TAL) aus dem Aszites zu isolieren, wurde der Aszites zunächst bei 481 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand zur späteren Analyse bei -20°C eingefroren. Die pelletierten Bestandteile des Aszites wurden in Zellkulturmedium aufgenommen, über Ficoll geschichtet und wie unter Abschnitt 2.12.3 beschrieben zentrifugiert, gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen.

### 2.12.5 Isolation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Tumore von Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die während der Operation entnommen wurden, wurden uns ebenfalls von Prof. Bauerschlag zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde in 10 cm Schalen mit PBS gewaschen um Blutreste zu entfernen. Anschließend wurde das Tumorgewebe in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert und in 5-10 ml PBS mit je einem Ansatz der Enzyme A, K und R des Tumor-Dissociation-Kits (Miltenyi Biotec) für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank verdaut. Zur Vereinzelnung wurde die Zellsuspension dann durch ein 100 µm Sieb gegeben und gewaschen, wobei die größeren Tumorbestandteile herausgefiltert wurden. Waren noch viele größere Tumorbestandteile im Durchlauf, wurde dieser wie in Abschnitt 2.12.3 beschrieben über Ficoll gegeben, gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen. Waren hingegen ausschließlich Zellen in der Größe von Lymphozyten im Durchlauf (visuelle Kontrolle am Mikroskop), wurden diese bei 481 g für 5 Minuten zentrifugiert und in Zellkulturmedium aufgenommen.

### 2.12.6 Etablierung von Tumorzellen aus Tumorgewebe oder Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Tumorzellen aus Zellbanken wie der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder der *american type culture collection* (ATCC) können käuflich erworben werden und stehen für die biomedizinische Forschung zur Verfügung. Möchte man dagegen die Interaktion von Tumorzellen und entsprechenden autologen T Zellen untersuchen, müssen Tumorzellen von Patienten selbst etabliert werden. Hierfür wurden Tumore von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Prof. Bauerschlag) wie unter Abschnitt 2.12.5 beschrieben zerkleinert und verdaut. Die Zellsuspension wurde zur Isolation der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) anschließend durch ein 100 µm Sieb gegeben und gewaschen. Die im Sieb verbliebenen Tumorstücke wurden dann in Zellkulturschalen oder -flaschen gegeben und in Zellkulturmedium kultiviert. Nach einigen Tagen wurden die löslichen Tumorreste entfernt und die adhärennten Zellen weiter kultiviert, wobei mindestens einmal pro Woche das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Nach mehreren Wochen waren in einigen Fällen genügend Zellen für eine Charakterisierung oder Experimente vorhanden. Zur Charakterisierung wurde die Expression der Proteinphosphatase CD45 als Leukozytenmarker, des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM), von HER2 und des Fibroblastenmarkerproteins CD90 durchflusszytometrisch analysiert. Zellen, die positiv für EpCAM und HER2 sowie negativ

## 2 Materialien und Methoden

für CD45 und CD90 waren, wurden mit Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) durch Dr. Jörg Weimer aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH als Tumorzellen wie in Acar-Perk et al. (2010) beschrieben bestätigt.

### 2.12.7 Magnetische Separation verschiedener Zellpopulationen

Verschiedene Zellpopulationen wurden mittels magnetischer Separation aus einem heterogenen Zellgemisch wie den PBMZ isoliert. Im Gegensatz zur negativen Isolation von Zellpopulationen, bei der alle ungewünschten Zellen markiert und zurückgehalten werden, wurden die Zellpopulationen im Rahmen dieser Arbeit mit einem monoklonalen Antikörper (mAk) gegen ein spezifisches Oberflächenantigen der gewünschten Zellpopulation markiert (positive Separation). Hierzu wurden zunächst die Fc-Rezeptoren der Zellen mit dem *FcR blocking reagent* (Miltenyi) blockiert um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Für die Isolation von  $\gamma\delta$  T Zellen wurde anschließend ein indirektes Zwei-Schritt-Verfahren (anti-TCR  $\gamma\delta$  MicroBead Kit, Miltenyi) bestehend aus Markierung der  $\gamma\delta$  T Zellen mit einem spezifischen Haptengekoppelten mAk und folgenden FITC-markierten anti-Hapten-Microbeads verwendet. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden direkt mit spezifischen Microbead-gekoppelten mAk markiert (CD4- bzw. CD8 MicroBeads, Miltenyi). Das Zellgemisch wurde nun über eine Säule in einem Magneten gegeben, wobei die markierte Zellpopulation durch das in der Säule verstärkte Magnetfeld zurückgehalten wurde. Nach einmaligem Waschen der Säule wurde diese aus dem Magneten entfernt und die zu isolierende Zellpopulation von der Säule eluiert. Typischerweise war die durchflusszytometrisch überprüfte Reinheit der isolierten Zellpopulationen größer als 98%.

### 2.12.8 Generierung von kurzzeit $\gamma\delta$ T Zelllinien

Zur Generierung von kurzzeit  $\gamma\delta$  T Zellen wurden aus Vollblut oder aus Leukozytenkonzentraten PBMZ isoliert (siehe Abschnitt 2.12.3). Die PBMZ wurden in Zellkulturmedium auf 1 Mio/ml eingestellt und zur selektiven Expansion von  $\gamma\delta$  T Zellen mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat in Zellkulturplatten stimuliert und unter Zugabe von 50 U/ml IL-2 kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde erneut IL-2 hinzugegeben und je nach Bedarf das Medium gewechselt oder die Zellen gesplittet. In den meisten Fällen erreichte die kurzzeit  $\gamma\delta$  T Zelllinie nach 12 bis 14 Tagen eine Reinheit größer als 95%, wobei spenderabhängig eine Expansion um den Faktor 100-1000 erreicht wurde.

### 2.12.9 Generierung von kurzzeit $\alpha\beta$ T Zelllinien

Für die Generierung von CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup> kurzzeit  $\alpha\beta$  T Zelllinien wurden zunächst PBMZ isoliert und CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen magnetisch separiert. Die isolierten T Zellen wurden dann in Zellkulturmedium in Gegenwart von 100 U/ml IL-2 mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (A/E-Beads, *T cell Activation/Expansion Kit*, Miltenyi) im Verhältnis 1 Bead pro Zelle stimuliert. Die A/E-Beads wurden vorher über Nacht bei 4°C mit Antikörpern gegen CD2, CD3 und CD28 (jeweils 10  $\mu$ g/ml) inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde erneut IL-2 hinzugegeben und das Medium nach Bedarf gewechselt oder die Zellen gesplittet. Die Reinheit blieb über die gesamte Kulturzeit größer als 98%.

### 2.12.10 Herunterregulation von Galektin-3 mit siRNA

Die Transfektion mit *small interfering RNA* (siRNA) ist eine Methode zur transienten Herunterregulation eines Proteins. Die siRNA ist eine doppelsträngige RNA, die nach Einbringen in die Zelle in den von mehreren Proteinen gebildeten *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingelagert wird. Die eingelagerte siRNA wird gespalten, wobei der verbleibende Strang als Template dient um komplementäre mRNAs zu finden, die nach Erkennung gespalten werden. Die mRNA steht somit nicht mehr zur Translation zur Verfügung, sodass kein Protein gebildet werden kann.

Zur Herunterregulation von Galektin-3 in PDAC Zellen wurde die in Tabelle 2.12 aufgelistete siRNA verwendet. Die Herunterregulation wurde in 12er Platten nach dem *reverse transfection* Protokoll durchgeführt. Für die Transfektion in einer Kavität wurden 12 pmol siRNA (durch Titration bestimmt) und 2  $\mu$ l Lipofectamin<sup>®</sup> RNAiMAX in 200  $\mu$ l Optimem Medium für 10-20 Minuten in der Kavität inkubiert. Lipofectamin<sup>®</sup> RNAiMAX (Invitrogen, ThermoFisherScientific, Karlsruhe) ist ein Transfektionsreagenz auf Lipidbasis, das für die Transfektion von siRNAs optimiert ist. Anschließend wurden 150.000 PDAC Zellen in 1 ml Zellkulturmedium ohne Antibiotika aber mit 10 % FKS hinzugegeben. Der Zeitpunkt der optimalen Herunterregulation wurde durchflusszytometrisch und per WesternBlot analysiert. 72 Stunden nach der Transfektion war die geringste Galektin-3 Expression zu detektieren. Als Kontrolle dienten untransfizierte PDAC Zellen sowie mit einer siRNA mit niedrigem GC-Gehalt (Stealth RNAi siRNA negative control lo GC, Invitrogen, ThermoFisherScientific, Karlsruhe) transfizierte PDAC Zellen.

### 2.12.11 Analyse der Zellmigration im Wundheilungsassay

Zur Analyse des Einflusses von Galektin-3 auf die Migration von PancTu-I Zellen wurde Galektin-3 wie unter Abschnitt 2.12.10 mittels siRNA herunterreguliert oder die Zellen mit kontroll siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen direkt in der 12er Platte in einem Wundheilungsassay eingesetzt. Hierfür wurde mit einer Pipettenspitze eine „Wunde“ in der konfluenten Zellschicht induziert und über 24 Stunden in der JuLi Br Mikroskopeinheit beobachtet, ob die Zellen diesen Riss wieder schließen können. Das JuLi Br macht zu diesem Zweck alle fünf Minuten ein Bild der jeweiligen „Wunde“.

### 2.12.12 Analyse von Tumorzellen mit dem xCelligence System

Das xCelligence *Real-Time Cell Analyzer* (RTCA) System (ACEA, San Diego, USA) ist ein Gerät mit dem unter anderem die Lyse von adhärennten Tumorzellen durch T Zellen ohne die Inkorporation von Farbstoffen oder radioaktiven Markern analysiert werden kann. Das System basiert auf speziellen 96er E-Platten, deren Vertiefungen am Boden mit Goldelektroden beschichtet sind. Diese elektronischen Sensoren können die Impedanz von adhärennten Zellen messen. Die Impedanz kann durch verschiedene zelluläre Parameter wie Proliferation, Größe, Morphologie oder Adhäsion beeinflusst werden. Zellen, die am Boden der Kavität adhäreren, führen dabei zu einer Erhöhung der Impedanz, die in der Analysesoftware in der willkürlichen Einheit „Zellindex“ dargestellt wird. Breiten sich die Zellen weiter aus oder teilen sie sich, steigt die Impedanz weiter. Werden die adhärennten Zellen durch z.B. zytotoxische Zellen oder Triton-X-100, das häufig als Positivkontrolle für maximale Lyse verwendet wird, lysiert, lösen sie sich vom Boden ab und die Impedanz sinkt. Auf diese Weise kann die zytotoxische Aktivität von T Zellen auf adhärennte PDAC Zellen hervorragend analysiert werden. Die Vorteile dieser Methode bestehen in der langen Zeitspanne, über welche die Experimente verfolgt werden können, in der möglichen Analyse kleiner Effektor-Zielzell-Verhältnisse und in der möglichen Beobachtung der Regeneration der Tumorzellen. Anders als beim Standard-Zytotoxizitätstest, dem <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest, kann nicht nur ein Zeitpunkt pro Platte betrachtet werden, sondern die Impedanz kann jede Minute gemessen werden. Die im RTCA erhaltenen Ergebnisse sind mit im Standard-<sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest erhaltenen Ergebnissen vergleichbar (Oberget al., 2014). Allerdings können mit dem RTCA System keine Suspensionszellen betrachtet werden. Zur Analyse der Effekte von Galektin-3 auf PDAC Zellen wurden 5000 PDAC Zellen in 96er

E-Platten ausgesät und 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml oder 1 µg/ml Galektin-3 hinzugegeben. Die Impedanz (dargestellt als Zellindex) wurde über einen Zeitraum von 60 Stunden alle drei Minuten gemessen. Für die Analyse der zytotoxischen Aktivität von  $\gamma\delta$  T Zellen auf PDAC Zellen wurden 5000 PDAC Zellen in 96er E-Platten ausgesät und bis zum Erreichen der linearen Wachstumsphase und eines Zellindex von 1 wachsen gelassen (meist 24-48 Stunden). Zu diesem Zeitpunkt wurden kurzzeit aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen oder  $\alpha\beta$  T Zellen im zuvor austrierten Effektor-Zielzellverhältnis 25:1 mit oder ohne zusätzlichen Stimulus (300 nM BrHPP oder 1 µg/ml [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] bzw. [HER2xCD3]) zusammen mit 12,5 U/ml IL-2 hinzugegeben. Als Kontrollen diente das Wachstum von Tumorzellen allein und die Zugabe von Triton-X-100 zur Induktion von maximaler Lyse der PDAC Zellen. Der Zellindex bzw. die Lyse der PDAC Zellen durch die Effektorzellen wurde alle drei Minuten gemessen und zum Zeitpunkt der Zugabe der T Zellen auf 1 normalisiert, um die teilweise anfänglich leicht unterschiedliche Adhärenz in den verschiedenen Vertiefungen auszugleichen.

### 2.12.13 <sup>51</sup>Chrom Freisetzungstest

Zur Analyse der zytotoxischen Aktivität von T Zellen kann ein <sup>51</sup>Chrom Freisetzungstest verwendet werden. Dieser beruht auf der Freisetzung von radioaktivem <sup>51</sup>Chrom durch zuvor markierte Tumorzellen durch Lyse der Zellen. Hierzu wurden zunächst die zu analysierenden PDAC Zellen mit 50 µCi Natriumchromat (<sup>51</sup>Chrom) für eine Stunde markiert. Anschließend wurden kurzzeit aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen in unterschiedlichen Effektor-Zielzell-Verhältnissen hinzugegeben und in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 mit 1 µg/ml [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] restimuliert oder in Medium kultiviert. Nach fünfstündiger Inkubation wurden 80 µl des Überstandes auf eine 96er Filterplatte übertragen. Nach Trocknung unter dem Abzug wurde am nächsten Tag mit dem MiCroBeta Trilux  $\beta$ -Szintillationsmessgerät das freigesetzte <sup>51</sup>Chrom bestimmt. Die spezifische Lyse wurde anschließend mit folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{gemessene Lyse} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} * 100$$

## 2.13 Durchflusszytometrie

Zellen können in einem Durchflusszytometer nach Markierung durch mAk phänotypisch charakterisiert werden. Hierzu wird eine Zellsuspension in einer Trägerflüssigkeit in eine Mess-

## 2 Materialien und Methoden

küvette gebracht, wo es zur Hydrodynamischen Fokussierung und Vereinzelung der Zellen kommt, woraufhin die Zellen dann einen oder mehrere Laserstrahlen passieren. Ein Teil des Laserlichtes wird von den Zellen abgelenkt. Hierbei dient das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) als Maß für die Größe einer Zelle, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) als Maß für die Granularität. Sind Proteine auf Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten mAk markiert, werden die Fluorochrome durch das Laserlicht angeregt, wodurch Licht in einem für das Fluorochrom spezifischen Wellenlängenbereich emittiert wird. Auf diese Weise lassen sich Proteine sowohl auf der Zelloberfläche, als auch innerhalb der Zelle nachweisen. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Proben wurden mit der Software CellQuest Pro (BD, Heidelberg), FACS DIVA (BD, Heidelberg) oder FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, USA) analysiert.

### 2.13.1 Oberflächenmarkierung

Zur Markierung von Oberflächenmolekülen auf Zellen wurden  $10^5$ - $2 \times 10^5$  Zellen in 96er Spitzbodenplatten überführt, mit FACS-Waschpuffer (WP) gewaschen (239 g, 4 Minuten) und dann mit 5-10  $\mu$ l je Antikörper (Konzentrationen und Verdünnungen siehe Abschnitt 2.6) für 25 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zwei Mal mit 100  $\mu$ l WP gewaschen. War der Erstantikörper Fluorochrom-gekoppelt, wurden die Zellen anschließend in 1% PFA in PBS fixiert und konnten so für längere Zeit im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. Wurde ein unmarkierter oder biotinylierter Erstantikörper verwendet, wurde ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 100  $\mu$ l WP wurden die Zellen dann auch in diesem Fall mit 1% PFA in PBS fixiert. Als Kontrollen dienten Antikörper mit dem gleichen Isotyp wie der für das Zielantigen verwendete Antikörper (Isotypkontrollen), die gegen Antigene gerichtet waren, die nicht in den untersuchten Zellen auftraten.

### 2.13.2 Intrazelluläre Markierung

Für die Markierung von intrazellulären Proteinen wurden  $10^5$ - $2 \times 10^5$  Zellen in 96er Spitzbodenplatten überführt und mit 150  $\mu$ l Staining-Puffer (SP) ein Mal gewaschen (239 g, 4 Minuten). Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Cytofix/Cytoperm fixiert und permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 100  $\mu$ l Perm/Wash wurden die Zellen mit 50-100  $\mu$ l Antikörper für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrritte mit 100  $\mu$ l Perm/Wash bevor die Zellen in 100  $\mu$ l SP aufgenommen und direkt am



Durchflusszytometer gemessen wurden. Bei Bedarf wurde vor der Markierung von intrazellulären Proteinen eine Markierung von Oberflächenmolekülen durchgeführt.

### 2.13.3 Absolutzellzahlbestimmung mittels *standard cell dilution analysis*

Die Absolutzellzahl von T Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach Primär- oder Restimulation ist ein Indikator für die Proliferation. Um die Absolutzellzahl einer Zellpopulation innerhalb eines heterogenen Zellgemisches zu bestimmen, wurde die im Labor Kabelitz/Wesch etablierte *standard cell dilution analysis* (SCDA) verwendet (Pechhold et al., 1994a). Bei dieser durchflusszytometrischen Methode wird die zu analysierende Zellpopulation mit mAk markiert und tote Zellen über Propidiumiodid (PI) ausgeschlossen. Hierfür wurde mit 0,2  $\mu\text{g/ml}$  eine geringe Konzentration von PI verwendet, um das PI Signal im FL3-Kanal des FACS Calibur detektieren zu können, wobei der FL2-Kanal für die Analyse von Oberflächenmarkern frei bleibt. PI kann durch die beschädigte Zellmembran diffundieren und interkaliert in die DNA der Zelle, wodurch die Fluoreszenz verstärkt und das Emissionsmaximum verschoben wird. Außerdem wird das zu untersuchende Zellgemisch in eine definierte Menge Standardzellen aufgenommen, wodurch dann wie weiter unten beschrieben auf die Absolutzellzahl der markierten Population rückgerechnet werden kann. Als Standardzellen dienten magnetisch separierte  $\text{CD4}^+$  T Zellen, die für die Generierung eines möglichst starken Fluoreszenzsignals mit biotinylierten mAk gegen MHC I (Klon W6/32, 50  $\mu\text{g/ml}$ ), gegen CD2 (Klon OKT11, 30  $\mu\text{g/ml}$ ), gegen CD3 (Klon OKT3, 50  $\mu\text{g/ml}$ ), gegen den  $\alpha\beta$  TZR (Klon BMA031, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) und gegen CD4 (Klon OKT4, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) bei 4°C für 30 Minuten markiert wurden. Nach Waschen mit WP (317 g, 5 Minuten) wurde zusätzlich mit einem biotinylierten Ziege-anti-Maus mAk (100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, bevor zwei weitere Male mit WP gewaschen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit APC-markiertem Streptavidin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und nach zwei weiteren Waschschritten in 1 % PFA in PBS über Nacht fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Standardzellen auf  $10^7/\text{ml}$  in WP eingestellt und konnten so für mindestens 6 Monate bei 4°C gelagert werden (modifiziert nach Pechhold et al., 1994a).

Für die Analyse der Absolutzellzahl von  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen wurden 100.000-250.000 PBMZ in Gegenwart oder Abwesenheit von Tumorzellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 50:1 oder 25:1) mit 300 nM BrHPP oder 2,5  $\mu\text{M}$  Zoledronat in Gegenwart von 50 IU/ml IL-2 aktiviert. An Tag 0 sowie an Tag 6-8 nach Stimulation wurde die Absolutzellzahl der  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen bestimmt. Hierfür wurde zunächst 80  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung Überstand abgenommen und dann die

## 2 Materialien und Methoden

Zellen in 96er Spitzbodenplatten überführt. Die Vertiefungen wurden dann mit PBS gespült, welches zur Vermeidung von Zellverlusten mit denselben Spitzen ebenfalls in die Spitzbodenplatte überführt wurde. Nach einem Waschschrift mit WP (239 g, 4 Minuten) wurden die Zellen dann mit dem FITC-markierten mAk gegen die V $\gamma$ 9-Kette des TZR (Klon 7A5) für 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit WP wurden die Zellen dann in 100  $\mu$ l Standardzell-Puffer ( $10^5$  Standardzellen/ml + 0,2  $\mu$ g/ml PI) aufgenommen.

Bei der Analyse am FACS-Calibur Durchflusszytometer wurde zunächst ein Gate für alle Zellen gesetzt. Anschließend wurden Standardzellen über ihre Fluoreszenz in Kanal 4 (APC) und ihre Fluoreszenz in Kanal 3 (PI) definiert. FITC-markierte V $\gamma$ 9<sup>+</sup>  $\gamma$  $\delta$  T Zellen wurden als negativ in Kanal 3 (lebend) und positiv in Kanal 1 definiert. Da das Zellgemisch in  $10^4$  Standardzellen aufgenommen wurde, konnte somit die absolute Zellzahl der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma$  $\delta$  T Zellen über die folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Absolutzellzahl } \gamma\delta \text{ T Zellen} = \frac{\text{rel. Anzahl } \gamma\delta \text{ T Zellen}}{\text{rel. Anzahl Standardzellen}} * 10^4 (\text{eingesetzte Standardzellen})$$

Da die Absolutzellzahl auch am Tag der Stimulation bestimmt wurde, konnte ebenfalls der Expansionsfaktor der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma$  $\delta$  T Zellen berechnet werden.

### 2.13.4 Bestimmung der Degranulation

Nach ihrer Aktivierung setzen  $\gamma$  $\delta$  T Zellen sekretorische Granula frei, die zytolytische Proteine wie z.B. Granzyme oder Perforin enthalten. Das *lysosomal associated membrane protein* (LAMP)-1/CD107a ist Bestandteil der Membran dieser Vesikel, welche bei der Degranulierung mit der Zellmembran fusionieren, wodurch LAMP-1 transient an der Zelloberfläche exprimiert wird. LAMP-1 kann somit nach Markierung durch mAk an der Zelloberfläche durchflusszytometrisch detektiert werden und dient als Markerprotein für die Degranulierung von T Zellen. Um die LAMP-1 Expression zu bestimmen, wurden zunächst 5000 PDAC Zellen in 96er Platten über Nacht ausgesät. Anschließend wurden 200.000 Zellen einer V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma$  $\delta$  kurzzeit T Zelllinie (in verschiedenen Effektor-Zielzell-Verhältnissen) in Gegenwart von 0,1  $\mu$ g/ml - 1  $\mu$ g/ml Galektin-3 und 10  $\mu$ l eines PE-markierten mAk gegen CD107a (Klon: H4A3) hinzugegeben und mit 300 nM BrHPP restimuliert. Nach einer Stunde wurde 3  $\mu$ M Monensin hinzugefügt. Monensin neutralisiert den sauren pH der Endosomen und verhindert somit den Abbau der Fluorochrom-konjugierten CD107a mAk-Komplexe (Chan and Kaur, 2007). Nach weiteren drei Stunden wurden die Zellen mit einem FITC-markierten mAk gegen die V $\gamma$ 9  $\gamma$  $\delta$

TZR markiert (Klon: 7A5, Protokoll für Oberflächenmarkierung) und die LAMP-1 Expression am FACS-Calibur gemessen.

### 2.13.5 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, der in vielen physiologischen Prozessen wie z.B. der Embryogenese eine Rolle spielt. Bei der Apoptose kommt es zunächst zum Verlust der Membranasymmetrie gefolgt von der Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns sowie dem Abschnüren der apoptotischen Vesikel. Beim Verlust der Membranasymmetrie gelangt das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS), welches normalerweise nur intrazellulär zu finden ist, an die Zelloberfläche. PS an der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen kann durch Fluorochrom-markiertes Annexin-V, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS, durchflusszytometrisch detektiert werden. Eine spätere Phase der Apoptose geht mit dem Verlust der Membranintegrität einher, wodurch lebend/tot Farbstoffe wie PI in die Zelle gelangen können. Lebende Zellen sind somit Annexin-V und PI-negativ, wohingegen Zellen in früher Apoptose Annexin-V positiv und PI negativ sind. Spätapoptotische oder nekrotische Zellen sind hingegen Annexin-V und PI positiv.

Um zu überprüfen, ob Galektin-3 Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen auslöst, wurden  $10^6$  Zellen einer V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  kurzzeit T Zelllinie für 24 Stunden mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  - 1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 oder zur Kontrolle mit Galektin-9 in 24er Platten kultiviert. Außerdem wurden als Positivkontrolle V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  kurzzeit T Zelllinien mit Etoposid (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zur Induktion von Zelltod kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in vier Ansätze für Kompensationskontrollen aufgeteilt und nach Waschen mit *Annexin-V binding buffer* nicht markiert oder mit Annexin-V-FITC (1:10, MabTag, Friesoythe) allein, PI allein (2  $\mu\text{g/ml}$ , Serva, Heidelberg) oder Annexin-V und PI markiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit *Annexin-V binding buffer* wurden die Zellen in *Annexin-V binding buffer* aufgenommen und direkt am FACS-Calibur gemessen.

### 2.13.6 Lokalisation und Koloaliation von Galektin-3

Die Lokalisation von Proteinen und deren Koloaliation mit anderen Proteinen kann u.a. mikroskopisch analysiert werden. Allerdings kann dabei nur sehr schwierig eine Quantifizierung stattfinden. Eine Quantifizierung ist allerdings mit dem Imagestream<sup>X</sup> MKII sehr gut möglich.

## 2 Materialien und Methoden

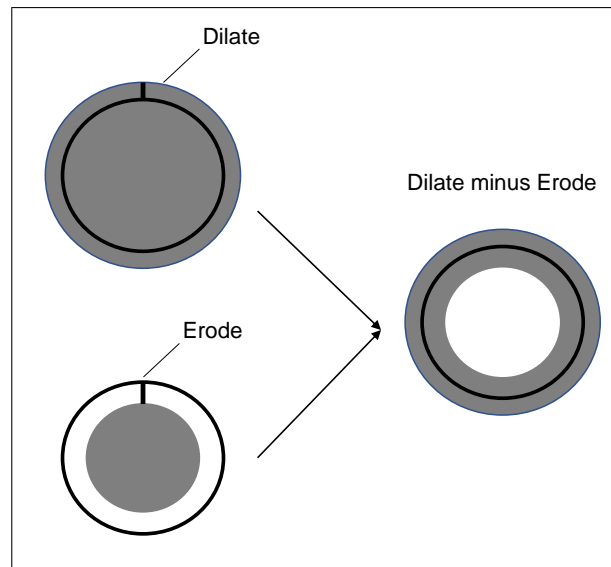
Dieses Gerät verbindet die Durchflusszytometrie mit der Mikroskopie, indem es mit einer Kamera hochauflösende Bilder jeder Zelle in bis zu 10 Fluoreszenzkanälen macht und dabei bis zu 5000 Zellen pro Sekunde analysiert. Über verschiedene Algorithmen können diese Bilder dann mit der IDEAS-Analysesoftware analysiert werden, wobei z.B. die Kolokalisation von Proteinen quantifiziert werden kann.

Zur Untersuchung der Lokalisation von Galektin-3 in PDAC Zellen wurden  $10^6$  PDAC Zellen nach dem Protokoll für intrazelluläre Färbung (siehe Abschnitt 2.13.2) zunächst mit einem mAk gegen Galektin-3 (Klon Gal397,  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und anschließend mit einem AlexaFluor488-konjugierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper markiert. Die Zellen wurden dann am Imagestream<sup>X</sup> MKII aufgenommen und mit der IDEAS-Software analysiert.

Um eine Kolokalisation von Galektin-3 mit den vesikulären Markerproteinen LAMP-1/CD107a, LAMP-3/CD63, Vti1b und Rab11 zu untersuchen, wurden  $10^6$  PDAC Zellen nach dem Protokoll für intrazelluläre Färbung mit einem mAk gegen Galektin-3 (Klon M3/38,  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und folgendem AlexaFluor647-konjugierten Huhn-anti-Ratte Sekundärantikörper ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) markiert. Rab11 wurde mit einem polyklonalen Antikörper ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und folgendem AlexaFluor555-konjugierten Esel-anti-Kaninchen Sekundärantikörper ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), Vti1b mit einem mAk (Klon: 7/Vti1b,  $5 \mu\text{g/ml}$ ) und folgendem AlexaFluor555-konjugierten Esel-anti-Maus Sekundärantikörper ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) und CD63 (Klon MEM-259,  $250 \mu\text{g/ml}$ ) sowie CD107a (Klon H4A3,  $1,2 \mu\text{g/ml}$ ) mit PE-konjugierten mAk markiert. Die Zellen wurden anschließend am Imagestream<sup>X</sup> MKII aufgenommen und mit dem *Bright Detail Similarity* Algorithmus der IDEAS-Software analysiert. Dieser Algorithmus analysiert die hellsten Punkte eines Fluoreszenzbildes und vergleicht diese mit den hellsten Punkten eines zweiten Fluoreszenzbildes, wobei man frühestens ab einer *Bright Detail Similarity*  $> 2$  von einer Kolokalisation sprechen kann.

### 2.13.7 Analyse der Synapsen zwischen Tumorzellen und T Zellen

Um den Effekt der Synapsenbildung auf die Lokalisation von Galektin-3 zu untersuchen, wurden PancTu-I Zellen in 15 ml Eppendorf-Gefäßen pelletiert und in einer gleichen Zahl Effektorzellen einer kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinie aufgenommen. Nach 1, 3, 5, 10, 20 oder 45 Minuten wurden die Zellkonjugate kurz pelletiert und in  $100 \mu\text{l}$  Cytotfix/Cytoperm für 20 Minuten fixiert und permeabilisiert und für die Färbung in 96er Spitzbodenplatten überführt. Nach einem Waschschrift mit Perm/Wash wurden die Konjugate nach dem Protokoll für intrazelluläre Färbung mit einem mAk gegen Galektin-3 (Klon M3/38,  $10 \mu\text{g/ml}$ , 30 Mi-



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Peripheriemaske.** Über die *Dilate*-Funktion wurde auf Basis des EpCAM-Signals der Tumorzellen eine Maske generiert, die über die Zelloberfläche hinausragt (oben, grauer Kreis). Über die *Erode*-Funktion wurde die EpCAM-Maske Richtung Zellzentrum verkleinert (unten, grauer Kreis). Die Subtraktion der *Erode*- von der *Dilate*-Maske lieferte die Peripheriemaske, die die Zellperipherie und Zelloberfläche einschließt (grauer Ring).

nuten) und einem folgenden AlexaFluor555-konjugierten Ziege-anti-Ratte Sekundärantikörper (10  $\mu\text{g/ml}$ , 15 Minuten) markiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit Perm/Wash wurden die Konjugate in 50  $\mu\text{l}$  eines Antikörper-Mix bestehend aus einem APC-konjugierten mAk gegen EpCAM (Klon HEA-125, 0,55  $\mu\text{g/ml}$ ), einem BrilliantViolet421-konjugierten mAk gegen CD3 (Klon UCHT1, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) und CruzFluor488-konjugiertem Phalloidin (1:5000, Santa Cruz, Heidelberg) für 30 Minuten markiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit Perm/Wash wurden die Konjugate in 50  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und am Imagestream<sup>X</sup> MKII aufgenommen. Bei der Analyse mit der IDEAS-Software wurden zunächst über die Markierung von Phalloidin, CD3 und EpCAM Tumor-T-Zell-Konjugate identifiziert. Zur Definition der Zellperipherie wurde anschließend basierend auf dem EpCAM-Signal, welches die Oberfläche der Tumorzelle markiert, eine Peripheriemaske generiert. Hierfür wurde mit der *Dilate*-Funktion eine Maske definiert, die um ein Pixel größer ist als die Maske des EpCAM-Signals. Mit der *Erode*-Funktion wurde eine Maske definiert, die um sechs Pixel kleiner ist als die Maske des EpCAM-Signals. Die Subtraktion der Erode-Maske von der Dilate-Maske lieferte die ringförmige Peripheriemaske, die um einen Pixel über die Zelle hinaus- und sechs Pixel in die Zelle hineinragt und mit welcher das Galektin-3 Signal in der Zellperipherie analysiert werden konnte (schematisch dargestellt in Abbildung 2.1).

## 2.14 Biochemische Methoden

### 2.14.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde eine je nach Applikation unterschiedliche Anzahl von Zellen mit PBS gewaschen (317 g, 5 Minuten) und anschließend für 20 Minuten auf Eis in TNE-Lysepuffer lysiert. Zur Inhibition von Proteasen und Phosphatasen wurden dem Lysepuffer Natriumfluorid, Natriumorthovanadat und der complete<sup>TM</sup> Proteaseinhibitormix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hinzugefügt. Nach Zentrifugation mit 13.800 g für 10 Minuten bei 4°C befanden sich Zellreste im Pellet und die Proteine im Überstand, welcher in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Die erhaltenen Lysate wurden entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 2.14.2 Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration von Zelllysaten zu bestimmen, wurde der Bradford-Test verwendet. Der im Bradford-Reagenz (Thermo Fisher, Langenselbold) enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau verändert bei Bindung an basische Seitenketten sein Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm, was photometrisch beobachtet werden kann. Die Proteinkonzentration von Lysaten wurde mit dem *Coomassie Protein Assay Reagent* (Thermo Fisher, Langenselbold) nach Herstellerangaben anhand einer Standardkurve mit BSA bestimmt.

### 2.14.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Während der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das im Probenpuffer enthaltene stark negativ geladene Detergenz SDS bindet an die Proteine und verdeckt deren Eigenladung. Das im Probenpuffer ebenfalls enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert die Disulphidbindung, sodass die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgehoben wird, was dafür sorgt, dass die Proteine im Polyacrylamidgel nur nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde das NuPAGE-System von Thermo Fisher mit 4-12% Bis-Tris-Fertiggelen verwendet. 5-10  $\mu$ g Protein wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und

für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden anschließend in die Geltaschen überführt und bei 200 Volt für ca. 60 Minuten aufgetrennt.

#### 2.14.4 Western Blot

Nach der Trennung der Proteine mit der SDS-PAGE wurden sie aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierzu wurde eine kleine Transferkammer (Thermo Fisher, Langenselbold) mit Eiskühlung verwendet. Zunächst wurde eine Transferkassette von der Kathode zur Anode mit einem Schwamm, zwei Whatman-Papieren, dem Gel, der Nitrozellulosemembran, zwei weiteren Whatman-Papieren und einem weiteren Schwamm unter Ausschluss von Luftblasen zusammengebaut. Anschließend wurde die Transferkassette in die mit Transblot-Puffer gefüllte Transferkammer gehängt und die Proteine mit 100 Volt für eine Stunde auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Um den Transfer zu überprüfen, wurde die Membran für 5 Minuten mit Ponceau S gefärbt. Zur weiteren Verwendung der Membran wurde diese mit Wasser entfärbt und vor der Immunodetektion für eine Stunde mit einer Milchpulver-Blockierlösung blockiert. Anschließend wurde drei Mal für 15 Minuten mit TBS-T gewaschen und über Nacht mit Primärantikörper (siehe Tabelle 2.10) inkubiert. Anschließend wurde erneut drei Mal für 15 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem *horseradish peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 2.9) inkubiert wurde. Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran für eine Minute in ECL-Detektionsreagenz inkubiert und die Chemolumineszenz auf Hyperfilm ECL-Filmen dokumentiert.

#### 2.14.5 Sandwich ELISA

Proteine im Zellkulturüberstand wurden für diese Arbeit mit Sandwich ELISAs detektiert. Hierfür wurden zunächst 96er Maxisorp<sup>TM</sup> Platten mit einem Primärantikörper beschichtet, bevor der Zellkulturüberstand hinzugegeben wurde. Mit einem biotinylierten zweiten Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Analyten gerichtet ist, wurden die gebundenen Proteine markiert. Anschließend wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin an den Zweitantikörper gebunden. Die HRP kann das anschließend zugegebene Substrat umwandeln, sodass nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure ein gelber Farbkomplex entsteht, der bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 570 nm werden detektiert kann. Anhand einer Eichkurve kann dann die in den Proben enthaltene Proteinmenge bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

## 2 Materialien und Methoden

die Menge von Galektin-3 und Galektin-9 in Zellkulturüberständen (Verdünnung 1:2) mit entsprechenden Duoset ELISA Kits der Firma R&D Systems (Tabelle 2.6) bestimmt.

Zur Generierung von Zellkulturüberständen von Tumorzellen allein wurden PDAC Zellen in 96er Flachbodenplatten kultiviert und nach 24, 48 oder 72 Stunden Überstände entnommen. Zellkulturüberstände von T Zellen allein wurden generiert, indem zunächst aus PBMZ  $\gamma\delta$  T Zellen positiv isoliert und anschließend aus jeweils der Hälfte der  $\gamma\delta$  T Zell-negativen Fraktion  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T Zellen mit CD4-Beads bzw. CD8-Beads isoliert wurden. Die so erhaltenen reinen Populationen (Reinheit > 98%) wurden dann in 96er Rundbodenplatten mit 50 IU IL-2 kultiviert. Zusätzlich wurden die  $\alpha\beta$  T Zellen in einigen Ansätzen mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (Beads), die nach Herstellerangaben mit Antikörpern gegen CD2, CD3 und CD28 beschichtet wurden, oder *bispecific single chain variable fragment* (bscFv) [HER2xCD3] aktiviert. Die  $\gamma\delta$  T Zellen bzw. die  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen wurden selektiv mit dem synthetischen Phosphoantigen Bromhydrin-Pyrophosphat (BrHPP) oder dem *tribody* [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] aktiviert. Überstände aus Kokulturen von PDAC Zellen und T Zellen wurden generiert, indem zunächst für 24 Stunden PDAC Zellen in Flachbodenplatten ausgesät wurden und dann wie oben beschrieben frisch isolierte T Zellen oder kurzzeit aktivierte T Zelllinien mit 12,5 IU IL-2 hinzugegeben und stimuliert wurden. Im Falle von frisch isolierten T Zellen wurden Zellkulturüberstände nach 24, 48 oder 72 Stunden genommen, im Falle von kurzzeit aktivierten T Zelllinien nach 1, 3 oder 24 Stunden.

Zur Überprüfung der Zellkontaktabhängigkeit der Galektin-3 Freisetzung wurden PDAC Zellen in 24er Platten ausgesät und kurzzeit aktivierte T Zelllinien mit 12,5 IU IL-2 hinzugegeben, die in einigen Ansätzen durch einen Transwell-Einsatz von den Tumorzellen getrennt wurden. In einigen Fällen wurden die T Zellen dann durch bsAk stimuliert und nach 24 Stunden die Überstände entnommen.



# 3 Ergebnisse

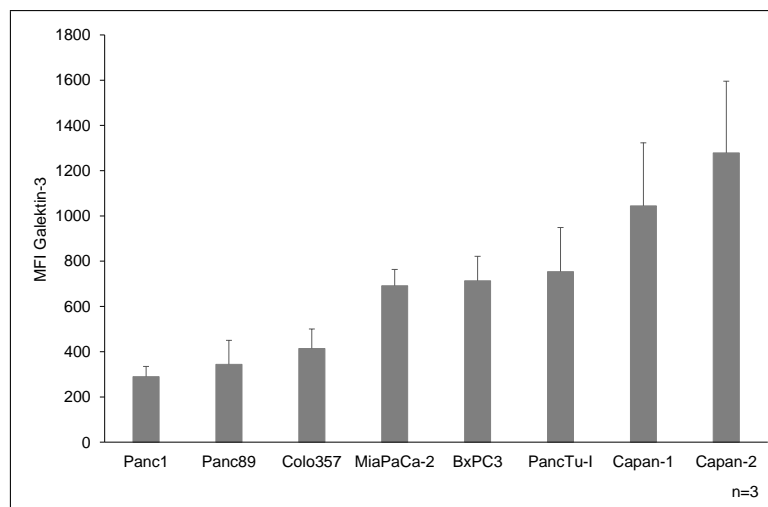
## 3.1 PDAC Zellen exprimieren Galektin-3

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Galektin-3 Expression in vielen Tumorentitäten untersucht. Song et al. (2012) konnten z.B. eine deutlich erhöhte Galektin-3 Expression in Gewebe von PDAC Patienten im Vergleich zu Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis bzw. zu normalem Pankreasgewebe nachweisen. Um diese Daten zu verifizieren und um weitere PDAC Zelllinien zu untersuchen, wurde die Expression von Galektin-3 in etablierten PDAC Zelllinien verschiedenen Differenzierungsgrades und Ursprungs mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Die Zelllinien wurden aus Primärtumoren (Panc1, PancTu-I, BxPC3, MiaPaCa-2 und Capan-2; G1-G3), aus Lymphknotenmetastasen (Panc89, Colo357; G1-G2) sowie aus Lebermetastasen (Capan-1; G1) generiert und wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Sebens/Röder zur Verfügung gestellt (Sipos et al., 2003). Zunächst wurde die intrazelluläre Galektin-3 Expression durchflusszytometrisch analysiert und in Abbildung 3.1 dargestellt. Hierbei sind die Zelllinien nach ansteigender Galektin-3 Expression angeordnet. Panc1-, Panc89- und Colo357 Zellen wiesen hierbei eine geringere Galektin-3 Expression auf als MiaPaCa-2- und BxPC3 Zellen. Die stärkste Galektin-3 Expression zeigte sich bei PancTu-I-, Capan-1- und Capan-2 Zellen.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die Galektin-3 Expression mit einer zweiten Methode, dem WesternBlot, überprüft (Abbildung 3.2). Im WesternBlot konnte die Galektin-3 Expression in den PDAC Linien bestätigt werden, eine Quantifizierung war jedoch aufgrund der unterschiedlichen  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle schwierig.

Von den PDAC Zelllinien PancTu-I, Panc89, Colo357 und Panc1 zeigten Panc1 Zellen eine geringere Galektin-3 Expression als Panc89 Zellen. PancTu-I- und Colo357 Zellen zeigten eine ausgeprägte Galektin-3 Expression. Beim Vergleich der PDAC Zelllinien Capan-1, Capan-2, MiaPaCa-2 und BxPC-3 zeigten Capan-2- und MiaPaCa-2 Zellen eine geringere Expression als Capan-1- und BxPC3 Zellen. Zusätzlich wurde die Expression von Galektin-3 auf der Zelloberfläche analysiert. PancTu-I Zellen, die intrazellulär eine höhere Galektin-3 Expression aufwiesen als Panc1 Zellen, exprimierten auch auf der Zelloberfläche mehr Galektin-3 als Panc1 Zellen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wiesen die PDAC Zelllinien, die aus Lymphknotenmetastasen etabliert wurden (Panc89- und Colo357 Zellen), eine geringere Galektin-3

### 3 Ergebnisse

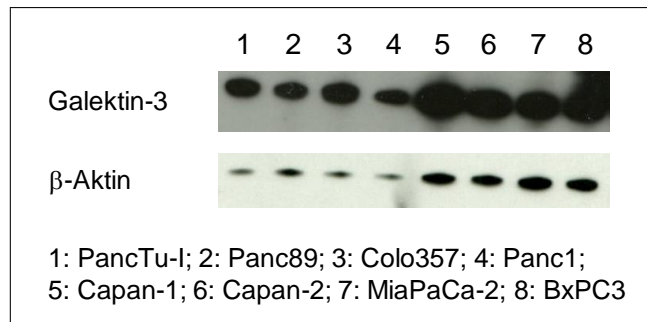


**Abbildung 3.1: Galektin-3 Expression in PDAC Zellen.** Verschiedene PDAC Zelllinien, deren Herkunft im Text beschrieben ist, wurden durchflusszytometrisch auf ihre intrazelluläre Galektin-3 Expression (anti-Galektin-3-AlexaFluor647, Klon M3/38) überprüft und nach aufsteigender Expression angeordnet. Als Kontrolle diente die Markierung mit einem AlexaFluor647-konjugierten mAk des Ratte IgG2a-Isotyps. Dargestellt ist die um die Isotypkontrolle korrigierte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)  $\pm$  die Standardabweichung aus drei Experimenten. Die Messung der Daten erfolgte am FACS Calibur, die Analyse mit der CellQuest Pro Software.

Expression als Zelllinien aus primären Tumoren (PancTu-I-, BxPC3-, MiaPaCa-2- und Capan-2 Zellen) auf. PancTu-I-, BxPC3- und MiaPaCa-2 Zellen zeigten eine sehr ähnliche Galektin-3 Expression. Lediglich Panc1 Zellen, die ebenfalls aus einem primären Tumor etabliert wurden, zeigten eine geringe Galektin-3 Expression. Die aus einer Lebermetastase etablierten Capan-1 Zellen wiesen eine sehr starke Galektin-3 Expression auf.

Je nach Zellpopulation, Kulturbedingungen oder Aktivierungsstatus der Zellen besitzt Galektin-3 unterschiedliche Funktionen und ist z.B. im Zytoplasma, im Nukleus oder auf der Zelloberfläche exprimiert (zusammengefasst in Dumic et al. 2006; Haudek et al. 2010). Um weitere Hinweise auf mögliche Funktionen von Galektin-3 in PDAC Zellen zu erhalten, wurde die Lokalisation näher untersucht. PancTu-I Zellen, die eine hohe Expression von Galektin-3 zeigten, wurden intrazellulär mit anti-Galektin-3 mAk markiert und am Imagestream Mark II analysiert. Es wurden Bilder und Daten von 5000 Zellen aufgenommen, von denen in Abbildung 3.3 fünf beispielhafte Zellen dargestellt sind. Auf der linken Seite ist das Durchlichtbild dargestellt, während rechts das Fluoreszenzbild von Galektin-3 abgebildet ist. Die Zahl im Durchlichtbild zeigt die Nummer der einzelnen im Fokus liegenden Zellen an. In allen fünf dargestellten Zellen war eine deutliche zytoplasmatische, vesikuläre Lokalisation von Galektin-3 zu erkennen. Dabei waren die Vesikel relativ gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, wobei ein Bereich, der möglicherweise den Nukleus darstellt, in den Zellen 1658 und 2653 nicht angefärbt wurde. Bei den anderen Zellen war dieser nicht angefärbte Bereich nicht zu erkennen, was an einer ande-

### 3.1 PDAC Zellen exprimieren Galektin-3

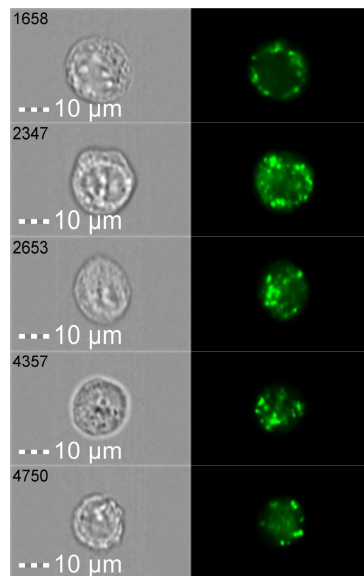


**Abbildung 3.2: WesternBlot Analyse von Galektin-3 in PDAC Zellen.** Lysate von PDAC Zellen wurden per SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran sequenziell mit Antikörpern gegen Galektin-3 (Klon Gal397) sowie gegen  $\beta$ -Aktin (Klon AC-15) und folgendem HRP-konjugierten Sekundärantikörper entwickelt. Dargestellt ist ein Blot von zwei vergleichbaren Experimenten.

ren Sichtebeine liegen könnte. Auch in Panc1 Zellen, die grundsätzlich eine deutlich geringere Galektin-3 Expression als PancTu-I Zellen aufwiesen, ist Galektin-3 in Vesikeln lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation von Galektin-3 wurde auch in T Zellen untersucht. Sowohl  $CD4^+$  oder  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T Zellen als auch  $\gamma\delta$  T Zellen zeigen ebenfalls eine vesikuläre Lokalisation von Galektin-3 (Daten nicht gezeigt).

Um die Vesikel, in denen Galektin-3 lokalisiert ist, genauer zu charakterisieren, wurde im Folgenden die Kolokalisation von Galektin-3 mit den vesikulären Markerproteinen CD107a, CD63, Rab11 sowie Vti1b untersucht. Das lysosomale Membran-assoziierte Protein 1 (LAMP1, CD107a) und CD63 (LAMP3) sind lysosomale Markerproteine. Eine Assoziation von Galektin-3 mit LAMP1 in Makrophagen ist in der Literatur beschrieben (Dong and Hughes, 1997). Vti1b ist ein Q-SNARE-Protein, das hauptsächlich auf Vesikeln im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerkes oder auf späten Endosomen zu finden ist (Kreykenbohm et al., 2002; Offenhäuser et al., 2011), wohingegen Rab11 hauptsächlich mit recycling Endosomen assoziiert (Takahashi et al., 2012). Analysiert wurde die Kolokalisation von Galektin-3 mit den Markerproteinen ebenfalls mit dem Imagestream<sup>X</sup> MKII. In Abbildung 3.4 A sind exemplarisch Bilder von drei Zellen, die mit anti-Galektin-3 Antikörper (Klon M3/38) sowie Antikörper gegen CD107a (Klon H4A3) und entsprechenden Sekundärantikörpern markiert wurden, dargestellt. In Abbildung 3.4 A ist links das Durchlichtbild, danach das Fluoreszenzbild von CD107a, gefolgt vom Fluoreszenzbild von Galektin-3 und rechts die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale (Kolokalisation) von drei repräsentativen PancTu-I Zellen dargestellt. Man kann hier gut erkennen, dass zwischen Galektin-3 und CD107a in PancTu-I Zellen keine Kolokalisation vorliegt. Durch den Algorithmus *Bright Detail Similarity* konnte mit dem Imagestream die Kolokalisation von vielen Zellen quantifiziert werden. Dieser Algorithmus analysiert die hellsten Punkte eines

### 3 Ergebnisse

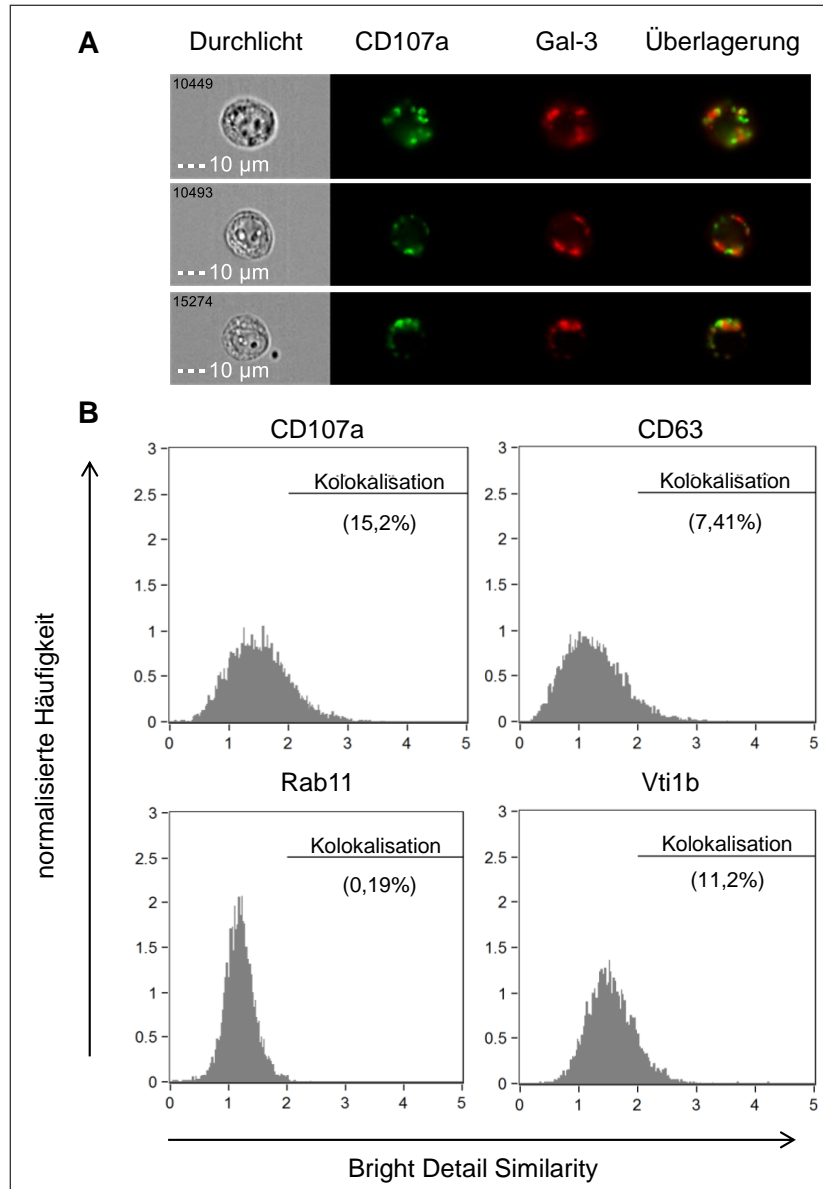


**Abbildung 3.3: Galektin-3 ist in Tumorzellen vesikulär lokalisiert.** Galektin-3 wurde in PancTu-I Zellen intrazellulär markiert (Klon Gal397, Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus-AlexaFluor488). Anschließend wurden 5000 Zellen am Imagestream<sup>X</sup> MKII gemessen. Dargestellt ist links das Durchlichtbild der Zelle und rechts das Fluoreszenzbild von Galektin-3 von fünf repräsentativen Zellen.

Fluoreszenzbildes und vergleicht diese mit den hellsten Punkten eines zweiten Fluoreszenzbildes. In Abbildung 3.4 B ist die *Bright Detail Similarity* des Signals von Galektin-3 mit CD107a, CD63, Rab11 und Vti1b von 6000-7000 PancTu-I Zellen dargestellt. Die in Klammern dargestellte Zahl jeder Grafik stellt den Anteil der Zellen mit einer *Bright Detail Similarity*  $> 2$  dar. Dies ist der Wert der *Bright Detail Similarity* ab der man frühestens von einer Kolo-kalisation sprechen kann. Ca. 15 % der PancTu-I Zellen zeigten eine Kolo-kalisation von Galektin-3 mit CD107a und 7% mit CD63. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die für Makrophagen beschriebene Assoziation von LAMP1 mit Galektin-3 in PancTu-I Zellen nicht so stark ausgeprägt ist. Zwischen Galektin-3 und Rab11 konnte keine Kolo-kalisation nachgewiesen werden. Hier wiesen nur 0,2% der Zellen eine *Bright Detail Similarity*  $> 2$  auf. Im Gegensatz dazu zeigten 11% der PancTu-I Zellen eine *Bright Detail Similarity*  $> 2$  im Signal von Galektin-3 mit Vti1b. Bei keinem der untersuchten Markerproteine sind die Werte der *Bright Detail Similarity* mit Galektin-3 größer als drei, sodass keine deutliche Kolo-kalisation vorliegt und auch in den einzeln betrachteten Bildern nicht zu beobachten ist.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass alle untersuchten PDAC Zellen sowie auch T Zellen Galektin-3 exprimieren. Dieses war vesikulär im Zytoplasma lokalisiert. Die erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass eine Kolo-kalisation mit den Markerproteinen CD107a, CD63, Rab11 und Vti1b nicht vorliegt.

### 3.1 PDAC Zellen exprimieren Galektin-3



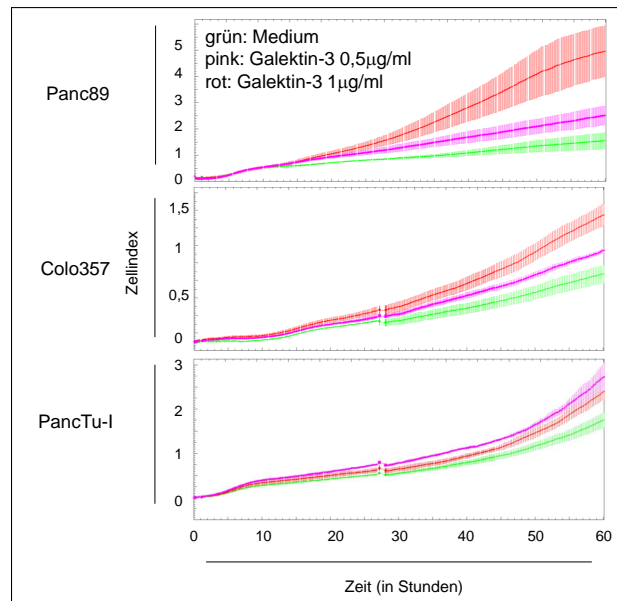
**Abbildung 3.4: Galektin-3 kolokalisiert nicht mit CD107a, CD63, Rab11 oder Vti1b.** Die vesikulären Markerproteine CD107a, CD63, Rab11 und Vti1b sowie Galektin-3 wurden intrazellulär in PancTu-I Zellen markiert und die Kolokalisation am Imagestream<sup>X</sup> MKII überprüft. A: Beispielhafte Darstellung der Färbung von CD107a, Galektin-3, der Überlagerung sowie des Durchlichtbildes von drei repräsentativen Zellen. B: Zusammenfassung von 6000-7000 Zellen. Die mögliche Kolokalisation wurde mit dem *Bright Detail Similarity Feature* der IDEAS Software analysiert. Die Zahl in Klammern gibt den Anteil der Zellen mit einer *Bright Detail Similarity* von mehr als 2 an.

## 3.2 Funktion von Galektin-3 in Tumorzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle analysierten PDAC Zelllinien Galektin-3 exprimieren, wurde in den folgenden Experimenten die Funktion von Galektin-3 in Tumorzellen genauer betrachtet. Hierfür wurde zunächst rekombinantes Galektin-3 zu PDAC Zellen mit geringer endogener Galektin-3 Menge (Panc89 Zellen), zu Zellen mit einer mittleren Galektin-3 Expression (Colo357 Zellen) und zu Zellen mit hoher Galektin-3 Expression (PancTu-I Zellen) gegeben. Im *Real Time Cell Analyzer* (RTCA) wurden mögliche Effekte von rekombinantem Galektin-3 auf die Impedanz der Tumorzellen über einen Zeitraum von 60 Stunden untersucht. Eine erhöhte Impedanz kann einerseits durch eine gesteigerte Proliferation der Zellen hervorgerufen werden, andererseits aber auch durch eine größere Ausdehnung einzelner Zellen. In Abbildung 3.5 ist die Impedanz der drei beispielhaften PDAC Zellen ohne Galektin-3 (grüne Linie), mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 (pinke Linie) oder mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 (rote Linie) als Zellindex (Mittelwert von Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung) dargestellt. Es war zu beobachten, dass alle PDAC Zellen unter Einfluss von Galektin-3 einen höheren Zellindex zeigten als PDAC Zellen ohne Galektin-3. Dieser Effekt war bei Panc89 Zellen am deutlichsten. Hier erreichten Tumorzellen mit Zugabe von 1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 einen Zellindex von ca. 5, Zellen mit Zugabe von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 einen Zellindex von ca. 2,5, wohingegen Zellen ohne Zugabe von Galektin-3 nur einen Zellindex von 1,5 erreichten. Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich für Colo357 Zellen. Hier erreichten Zellen mit Zugabe von 1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 einen Zellindex von 1,5. Nach Zugabe von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 wurde ein Zellindex von 1 erreicht, wohingegen Zellen ohne Galektin-3 einen Zellindex von ca. 0,75 erreichten. Bei PancTu-I Zellen war der Effekt von Galektin-3 etwas anders. Hier erreichten Zellen mit Zugabe von 1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 einen geringeren Zellindex (ca. 2,3) als Zellen nach Zugabe von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (2,75). Zellen ohne Zugabe von Galektin-3 erreichten auch hier einen niedrigeren Zellindex (1,75) als mit Galektin-3. Die Steigerung der Zellproliferation oder der Zellausdehnung durch rekombinantes Galektin-3 war bei Zellen mit geringer Galektin-3 Expression (Panc89 Zellen) am stärksten, gefolgt von einem etwas geringeren Effekt bei Zellen mit mittlerer Galektin-3 Expression (Colo357 Zellen). Bei Zellen mit hoher endogener Galektin-3 Expression war der Effekt von exogenem Galektin-3 am geringsten. Galektin-3, sei es nun endogen oder rekombinant hinzugegeben, scheint also eine Rolle bei der Proliferation oder dem *cell spreading* von PDAC Zellen zu spielen.

Um den Effekt von endogenem Galektin-3 in PDAC Zellen mit hoher Galektin-3 Expression zu untersuchen, wurde Galektin-3 in PancTu-I Zellen mittels RNA-Interferenz herunterreguliert und die Zellmigration in einem Wundheilungsassay analysiert. Hierfür wurde zunächst

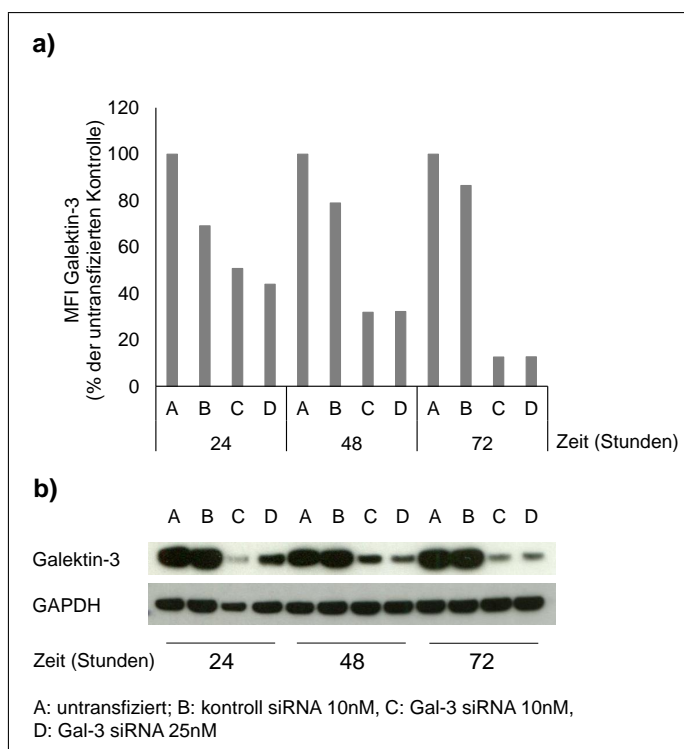
### 3.2 Funktion von Galektin-3 in Tumorzellen



**Abbildung 3.5: Die Proliferation oder das *cell spreading* von Tumorzellen wird durch Galektin-3 erhöht.** 5000 Panc89-, Colo357- oder PancTu-I Zellen wurden mit Medium (grüne Linie), 0,5 µg Galektin-3 (pinke Linie) oder 1 µg Galektin-3 (rote Linie) in 96er E-Plates ausgesät und im *Real Time Cell Analyzer (RTCA)* analysiert. Die Impedanz wurde über einen Zeitraum von 60 Stunden alle drei Minuten gemessen. Dargestellt ist der Zellindex als Mittelwert von Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung eines Experiments von zwei vergleichbaren.

die Funktionalität der erworbenen *small interfering RNA* (siRNA) untersucht (Abbildung 3.6). PancTu-I Zellen wurde in 12er Platten untransfiziert (A) oder mit kontroll siRNA (B) sowie mit 10 nM (C) und 25 nM (D) siRNA gegen Galektin-3 transfiziert kultiviert. Um den optimalen Zeitpunkt der Herunterregulation zu bestimmen, wurden die Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden durchflusszytometrisch (a) sowie per WesternBlot (b) untersucht. Um die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Galektin-3 Expression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten besser miteinander vergleichen zu können, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit kontroll siRNA oder mit Galektin-3 siRNA transfizierten Zellen auf die MFI der untransfizierten Zellen normalisiert. Schon nach 24 Stunden zeigte sich eine deutliche Reduktion der Galektin-3 Expression um ca. 50 %. Allerdings hatte auch die Transfektion mit kontroll siRNA nach 24 Stunden einen leichten Effekt auf die Galektin-3 Expression. Nach 48 und 72 Stunden war dieser Effekt allerdings vernachlässigbar klein. Die Herunterregulation von Galektin-3 durch die spezifische siRNA war nach 48 und 72 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden waren nur noch ca. 30 % der Galektin-3 Menge der untransfizierten Kontrolle vorhanden und nach 72 Stunden sogar nur noch ca. 10-15 %. Die Unterschiede zwischen einer Konzentration von 10 nM und 25 nM siRNA waren sehr gering. Auch in der Analyse der Galektin-3 Expression mit dem WesternBlot ließen sich diese Ergebnisse bestätigen. Hier zeigte sich ebenfalls

### 3 Ergebnisse

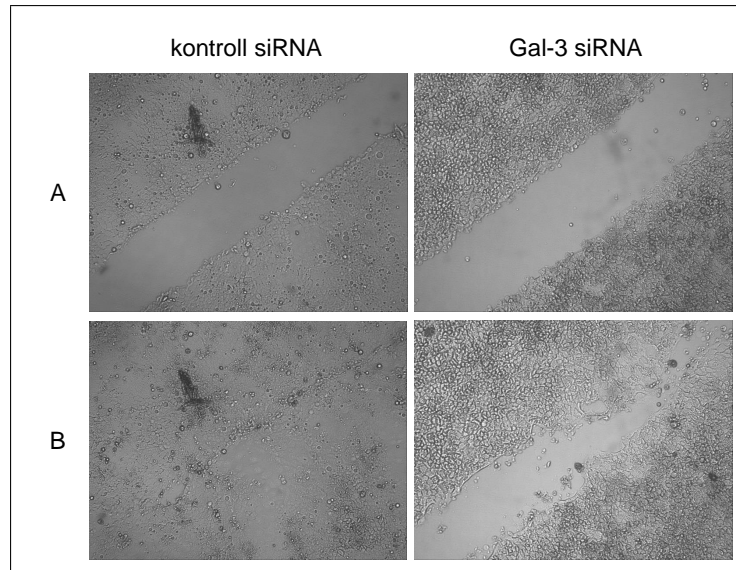


**Abbildung 3.6: Galektin-3 kann durch Einsatz von siRNA herunterreguliert werden.** PancTu-I Zellen wurden (A) untransfiziert oder (B) mit 10 nM kontroll siRNA, (C) 10 nM und (D) 25 nM Galektin-3 siRNA transfiziert kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Tumorzellen trypsiniert und der Galektin-3 Gehalt durchflusszytometrisch oder per WesternBlot analysiert. a): Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Galektin-3 ist als prozentualer Anteil der untransfizierten Zellen dargestellt. b): Nach Trennung der Proteine in einem Gel und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese erst mit einem Antikörper gegen Galektin-3, danach mit einem Antikörper gegen GAPDH und entsprechenden Sekundärantikörpern entwickelt.

eine Abnahme der Galektin-3 Expression von 24 Stunden über 48 Stunden zu 72 Stunden und auch kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen siRNA Konzentrationen. Ein Effekt der kontroll siRNA auf die Galektin-3 Expression konnte im WesternBlot hingegen nicht bestätigt werden. Die Expression von Galektin-3 blieb bis fünf Tage nach Transfektion auf einem stabil niedrigen Niveau, nahm dann jedoch wieder zu (Daten nicht gezeigt). 72 Stunden nach Transfektion wurden die PancTu-I Zellen in einem Wundheilungsassay eingesetzt und über 24 Stunden beobachtet, ob die Zellen die mit einer Pipettenspitze induzierte „Wunde“ in der konfluenten Zellschicht wieder schließen können. In Abbildung 3.7 sind vier der von JuLi Br aufgenommenen Bilder dargestellt. Auf der linken Seite sind die Bilder von mit kontroll siRNA transfizierten PancTu-I Zellen zu Beginn der Analyse (A) und nach 24 Stunden (B) gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Bilder von mit Galektin-3 siRNA transfizierten PancTu-I Zellen dargestellt. Es ist deutlich, dass die anfangs (A) noch gleichgroßen „Wunden“ nach 24 Stunden (B) sehr unterschiedlich sind. PancTu-I Zellen, die mit kontroll siRNA transfiziert sind, waren



### 3.2 Funktion von Galektin-3 in Tumorzellen



**Abbildung 3.7: Galektin-3 spielt eine Rolle bei der Migration von PDAC Zellen.** PancTu-I Zellen wurden mit kontroll siRNA (linke Seite) oder Galektin-3 siRNA (rechte Seite) transfiziert und nach 72 Stunden in einem Wundheilungsassay analysiert. Gezeigt sind die Bilder (A) zu Beginn der Analyse und (B) nach 24 Stunden.

in der Lage den Riss komplett zu schließen, konnten also migrieren. Im Gegensatz dazu waren PancTu-I Zellen mit herunterreguliertem Galektin-3 nur partiell in der Lage den Riss zu schließen. Am oberen rechten Bildrand ist der Riss zu Teilen geschlossen, wohingegen die „Wunde“ am unteren Bildrand überhaupt nicht geschlossen wurde. Galektin-3 scheint in PDAC Zellen also eine Rolle bei der Migration zu spielen.

### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen

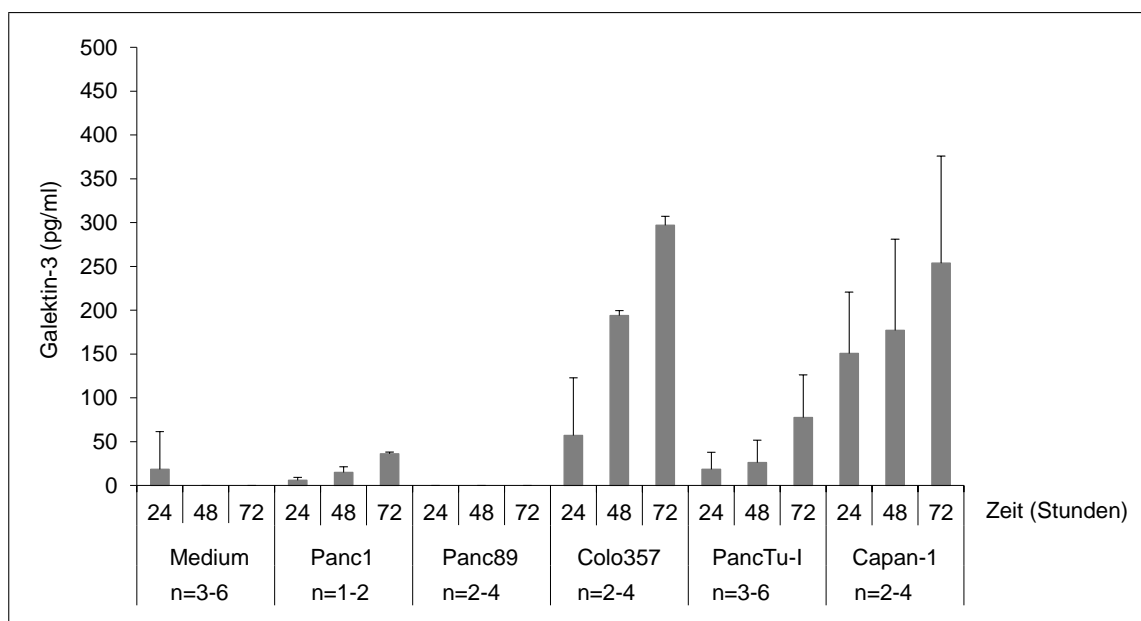
#### 3.3.1 PDAC Zellen und T Zellen alleine setzen wenig Galektin-3 frei

Da Galektin-3 sowohl von PDAC Zellen als auch von T Zellen exprimiert werden kann, wurde analysiert ob Galektin-3 von PDAC Zellen oder T Zellen auch freigesetzt wird. Hierfür wurden PDAC Zelllinien mit niedriger (Panc1, Panc89), mittlerer (Colo357) und hoher (PancTu-I, Capan1) Galektin-3 Expression in 96er Platten kultiviert und nach 24, 48 und 72 Stunden Zellkulturüberstände entnommen. Diese wurden mit einem ELISA für Galektin-3 auf die Galektin-3 Freisetzung untersucht. In Abbildung 3.8 ist zu erkennen, dass Panc89 Zellen kein Galektin-3 freisetzen. Panc1 Zellen setzten nur sehr geringe Mengen Galektin-3 frei, die im Bereich des Detektionslimit des ELISA lagen, wohingegen PancTu-I Zellen etwas größere Mengen Galektin-3 freisetzen. Colo357- und Capan-1 Zellen hingegen setzten noch höhere Mengen Galektin-3 frei. Die freigesetzte Galektin-3 Menge akkumulierte von 50 pg/ml (24 Stunden) über 200 pg/ml (48 Stunden) auf 300 pg/ml nach 72 Stunden bei 5000 ausgesäten Colo357 Zellen. Bei 10000 ausgesäten Capan-1 Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier waren nach 24 Stunden 150 pg/ml Galektin-3 im Zellkulturüberstand zu detektieren. Dies akkumulierte nach 72 Stunden auf ca. 250 pg/ml. Insgesamt war die gemessene Menge mit im Maximum 300 pg/ml jedoch sehr niedrig, sodass hier nur von sehr geringen Mengen freigesetztem Galektin-3 gesprochen werden kann.

Als Kontrolle für die Freisetzung von Galektin-3 wurde mit Galektin-9 ein anderes Galektin untersucht. Dieses wird ebenfalls von allen untersuchten PDAC Zellen und auch von T Zellen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die Freisetzung von Galektin-9 wurde in den gleichen Zellkulturüberständen, die für Abbildung 3.8 verwendet wurden, mit einem kommerziellen ELISA für Galektin-9 untersucht. Von keiner der untersuchten PDAC Zelllinien wurde Galektin-9 freigesetzt (Daten nicht gezeigt). Die Freisetzung geringer Mengen Galektin-3 durch PDAC Linien scheint also spezifisch für Galektin-3 zu sein.

Um zu analysieren, ob T Zellen Galektin-3 freisetzen, wurden verschiedene T Zellpopulationen mittels magnetischer Separation getrennt. Hierzu wurden zunächst aus PBMZ  $\gamma\delta$  T Zellen positiv separiert und anschließend aus jeweils der Hälfte der  $\gamma\delta$  T Zell-negativen Fraktion  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+ \alpha\beta$  T Zellen mit  $CD4$ -MicroBeads bzw.  $CD8$ -MicroBeads isoliert. Die erhaltenen reinen Populationen (Reinheit > 98 %) wurden dann in 96er Rundbodenplatten mit 50 IU IL-2 kultiviert. Zusätzlich wurden die  $\alpha\beta$  T Zellen in einigen Ansätzen mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (Beads), die mit Antikörpern gegen  $CD2$ ,  $CD3$  und  $CD28$  beschichtet waren, oder mit bsAk [HER2xCD3] aktiviert. Die  $\gamma\delta$  T Zellen bzw. die  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen

### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen

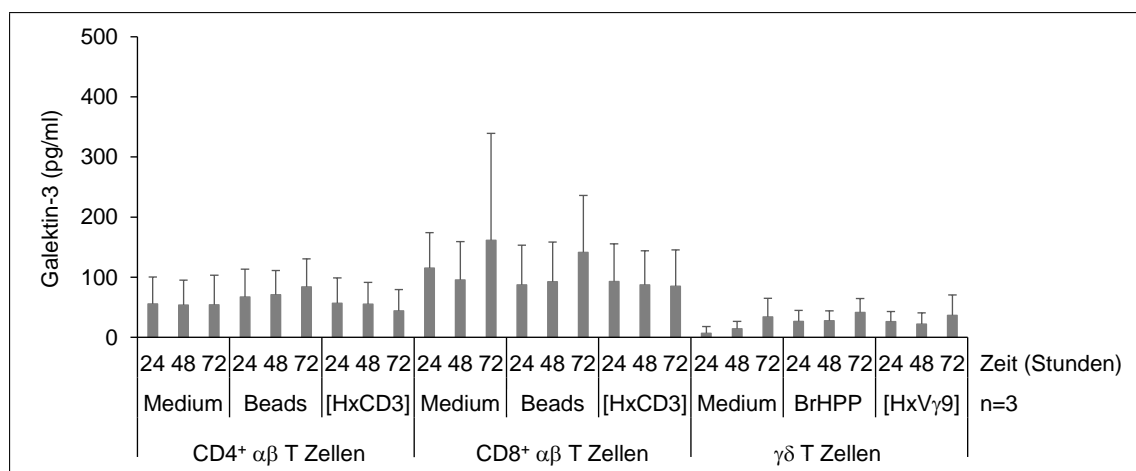


**Abbildung 3.8: Freisetzung von Galektin-3 durch Tumorzellen.** 5000 Zellen der PDAC Zelllinien Panc1, Panc89, Colo357, PancTu-I und 10.000 Capan-1 Zellen wurden für 24-72 Stunden kultiviert und nach den angegebenen Zeitpunkten Zellkulturüberstände genommen. Diese wurden mittels ELISA auf freigesetztes Galektin-3 überprüft. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Galektin-3 Menge im Überstand bestimmt in Doppelwerten aus ein bis sechs Experimenten.

wurden selektiv mit dem synthetischen Phosphoantigen Bromohydrin-Pyrophosphat (BrHPP) oder dem bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] aktiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Überstände entnommen und die Freisetzung von Galektin-3 durch ELISA bestimmt. In Abbildung 3.9 wird deutlich, dass auch T Zellen nur sehr wenig Galektin-3 freisetzen. Insbesondere γδ T Zellen setzten unabhängig von ihrer Aktivierung nur minimalste Mengen Galektin-3 frei. CD4<sup>+</sup> wie auch CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen setzten ebenfalls unabhängig von ihrer Stimulation nur geringe Mengen Galektin-3 frei. Nach 72 Stunden waren z.B. im Überstand von 200.000 unstimulierten CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen nur ca. 150 pg/ml zu detektieren.

Auch für T Zellen wurde die Freisetzung von Galektin-9 als Kontrolle analysiert. Hierzu wurde in den Überständen der gleichen Zellpopulationen, in deren Überstand die Galektin-3 Bestimmung durchgeführt wurde, ebenfalls Galektin-9 mit einem ELISA gemessen (Abbildung 3.10). Auch Galektin-9 wurde von γδ T Zellen unabhängig von ihrer Aktivierung nicht freigesetzt. Im Gegensatz dazu setzten CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen nach Stimulation mit Beads nach 72 Stunden ca. 150 pg/ml Galektin-9 frei. Unstimulierte sowie mit bsAk stimulierte CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen setzten ebenfalls eher kein Galektin-9 frei. Generell war die freigesetzte Galektin-9 Menge nach einer Stimulation von CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen deutlich höher als bei den anderen untersuchten Zellpopulationen. Nach der Stimulation mit [HER2xCD3] waren nach 72 Stunden ca.

### 3 Ergebnisse

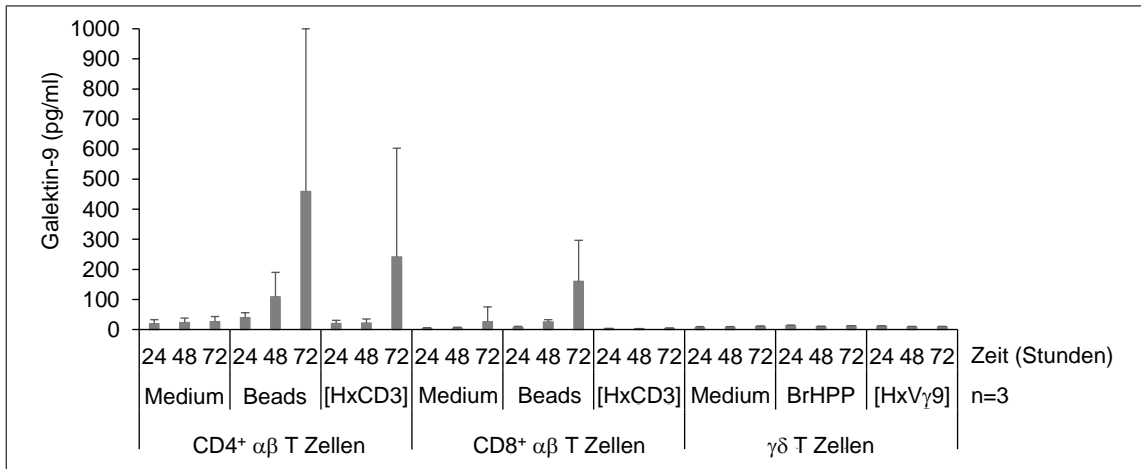


**Abbildung 3.9: Galektin-3 Freisetzung durch frisch isolierte T Zellen.** Verschiedene T Zellpopulationen wurden mittels magnetischer Separation aus PBMZ isoliert und 200.000 Zellen in Gegenwart von 50 IU IL-2 mit den entsprechenden Stimuli stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellkulturüberstände entnommen und mittels ELISA auf die Galektin-3 Menge überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von jeweils Doppelwerten von drei Spendern. Beads:  $\alpha$ CD2,  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 markierte Partikel. [HxV $\gamma$ 9]: bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9]. [HxCD3]: bsAk [HER2xCD3].

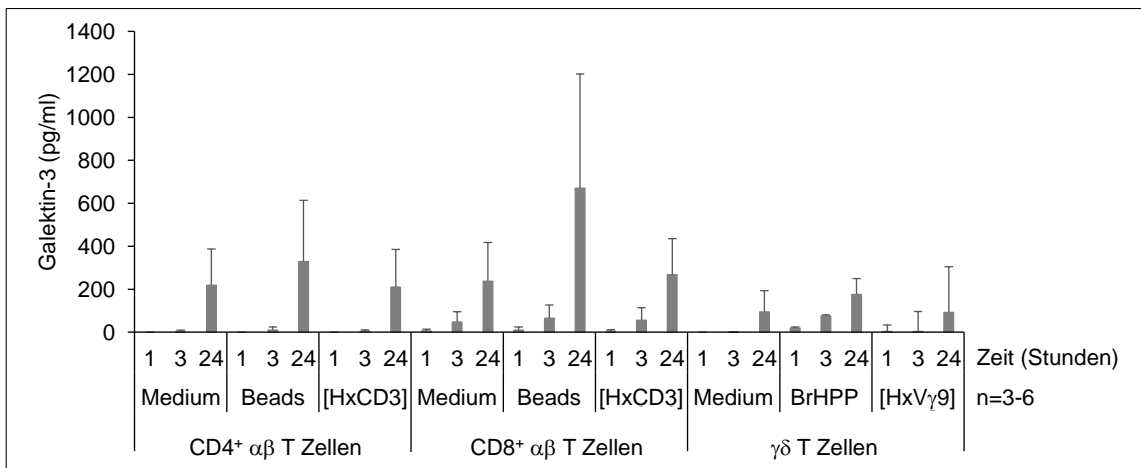
250 pg/ml Galektin-9 im Überstand nachzuweisen. Nach Stimulation mit  $\alpha$ CD2,  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 markierten Beads konnten schon nach 48 Stunden ca. 100 pg/ml Galektin-9 im Überstand nachgewiesen werden. Dies stieg nach 72 Stunden auf fast 500 pg/ml an. Die Galektin-9 Freisetzung durch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen könnte also durch eine Kostimulation über CD28 beeinflusst werden.

Bei der Betrachtung autologer kurzzeit aktivierter T Zelllinien zeigte sich eine veränderte Kinetik der Freisetzung von Galektin-3. Zur Generierung von kurzzeit aktivierten  $\alpha\beta$  T Zelllinien wurden die isolierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen derselben Spender mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (Beads), die mit Antikörpern gegen CD2, CD3 und CD28 beschichtet waren, in der Gegenwart von IL-2 für 14 Tage expandiert. Um kurzzeit aktivierte  $\gamma\delta$  T Zelllinien zu erhalten, wurden PBMZ derselben Spender mit Zoledronat ebenfalls in Gegenwart von IL-2 stimuliert und expandiert. Nach der Expansion von 14 Tagen wurden kurzzeit aktivierte T Zelllinien erneut mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (Beads) bzw. BrHPP oder bsAk [HER2xCD3] bzw. [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] restimuliert oder in Medium kultiviert. Nach einer, drei oder 24 Stunden wurden Überstände entnommen und die Freisetzung von Galektin-3 und Galektin-9 untersucht. Die Zeitpunkte der Entnahme ergaben sich aus der im Normalfall deutlich schnelleren Aktivierung von kurzzeit aktivierten T Zelllinien im Gegensatz zu frisch isolierten T Zellen. In Abbildung 3.11 ist die Freisetzung von Galektin-3 dargestellt. Wie schon für frisch isolierte  $\gamma\delta$  T Zellen gezeigt wurde, setzten kurzzeit aktivierte  $\gamma\delta$  T Zellen ebenfalls wenig Galektin-3 frei. Die Menge war allerdings höher als die von frisch isolierten  $\gamma\delta$

### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen

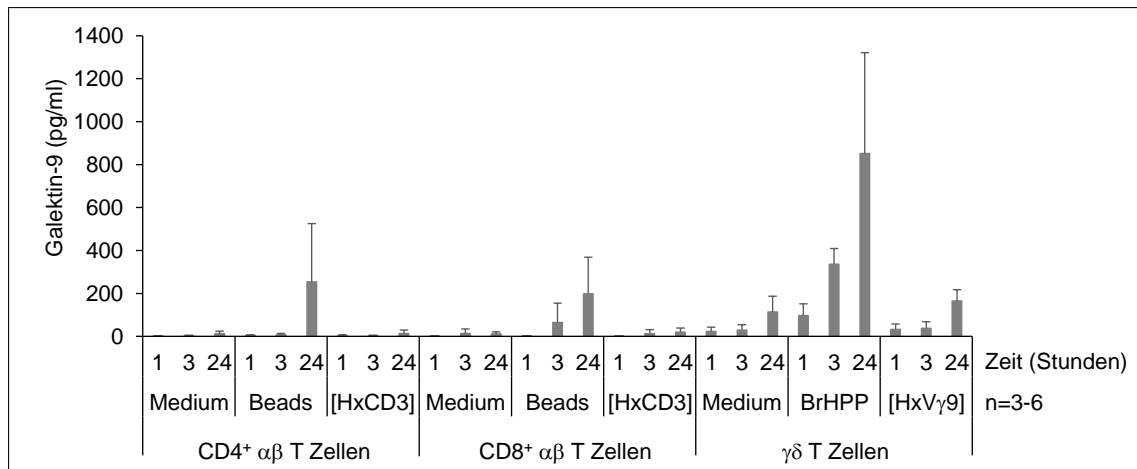


**Abbildung 3.10: Freisetzung von Galektin-9 durch frisch isolierte T Zellen.** Durch magnetische Separation wurden CD4+ alpha beta T Zellen, CD8+ alpha beta T Zellen und gamma delta T Zellen aus PBMZ isoliert und 200.000 Zellen in Gegenwart von 50 IU IL-2 mit den aufgeführten Stimuli stimuliert. Zu unterschiedlichen angegebenen Zeitpunkten wurden Zellkulturüberstände genommen und mittels ELISA auf ihre Menge an Galektin-9 überprüft. Die Bestimmung wurde in Doppelwerten mit T Zellen von drei Spendern durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung. Beads: alpha CD2, alpha CD3 und alpha CD28 markierte Partikel. [HxV gamma 9]: bsAk [(HER2)2xV gamma 9]. [HxCD3]: bsAk [(HER2)xCD3].



**Abbildung 3.11: Freisetzung von Galektin-3 durch kurzzeit-expandierte T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4+ alpha beta T Zellen sowie CD8+ alpha beta T Zellen wurden mit Beads, kurzzeit aktivierte V delta 2 gamma delta T Zellen mit 300nM BrHPP in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 restimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Überstände genommen und auf ihre Menge an Galektin-3 überprüft. Die Balken stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von drei bis sechs Spendern dar. Beads: alpha CD2, alpha CD3 und alpha CD28 markierte Partikel. [HxV gamma 9]: bsAk [(HER2)2xV gamma 9]. [HxCD3]: bsAk [(HER2)xCD3].

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.12: Kurzzeit-expandierte T Zelllinien setzen abhängig vom Stimulus geringe Mengen Galektin-9 frei.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen wurden mit Beads, Vδ2 γδ T Zellen mit 300nM BrHPP in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 restimuliert. Das freigesetzte Galektin-9 wurde nach ein, drei oder 24 Stunden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus Doppelwerten von drei bis sechs Spendern. Beads: αCD2, αCD3 und αCD28 markierte Partikel. [HxVγ9]: bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]. [HxCD3]: bsAk [HER2xCD3].

T Zellen. Es gibt eine leichte Tendenz, dass 24 Stunden nach Restimulation mit BrHPP etwas mehr Galektin-3 freigesetzt wurde als bei unstimulierten oder mit bsAk restimulierten kurzzeit aktivierten γδ T Zelllinien. Auch nach Stimulation mit Beads setzten kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> αβ T Zelllinien mehr Galektin-3 frei als nicht restimulierte oder mit bsAk restimulierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> αβ T Zelllinien. Die Menge ist insgesamt deutlich höher als die von kurzzeit aktivierten γδ T Zelllinien und mit ca. 700 pg/ml bei kurzzeit aktivierten CD8<sup>+</sup> αβ T Zelllinien ungefähr doppelt so hoch wie bei kurzzeit aktivierten CD4<sup>+</sup> αβ T Zelllinien (ca. 350 pg/ml). Insgesamt setzten kurzzeit aktivierte T Zelllinien deutlich mehr Galektin-3 frei als frisch isolierte T Zellen. Nach ein bzw. drei Stunden konnte Galektin-3 jedoch noch nicht im Überstand detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die Freisetzung ein etwas langsamerer Prozess ist.

Als Kontrolle diente abermals die Freisetzung von Galektin-9 (Abbildung 3.12). Kurzzeit aktivierte αβ T Zelllinien setzten Galektin-9 ausschließlich nach Stimulation durch Aktivierungs-/Expansions-Partikel frei. Bei kurzzeit aktivierten CD8<sup>+</sup> αβ T Zelllinien war die Menge ungefähr vergleichbar mit der Galektin-9 Freisetzung durch frisch isolierte CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen (200 pg/ml nach 24 Stunden vs. 160 pg/ml nach 72 Stunden). Im Gegensatz dazu war die Freisetzung von Galektin-9 durch kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup> αβ T Zelllinien nach Stimulation mit Beads trotz der gleichen eingesetzten Zellzahl von 200.000 Zellen deutlich geringer als von frisch isolierten CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen. Auch eine Freisetzung nach Restimulation durch [HER2xCD3] konnte bei kurzzeit aktivierten CD4<sup>+</sup> αβ T Zelllinien im Gegensatz zu frisch

### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen

isolierten CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht beobachtet werden. Bei kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien zeigte sich ein deutlich verändertes Bild im Gegensatz zu frisch isolierten  $\gamma\delta$  T Zellen (keine Freisetzung von Galektin-9). Nach 24 Stunden konnten nach Kultur von nicht restimulierten oder mit bsAk restimulierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien geringe Mengen Galektin-9 im Überstand detektiert werden. Nach Restimulation mit BrHPP wurden schon nach einer Stunde 100 pg/ml Galektin-9 freigesetzt. Die Menge stieg über ca. 350 pg/ml nach drei Stunden auf 850 pg/ml nach 24 Stunden an.

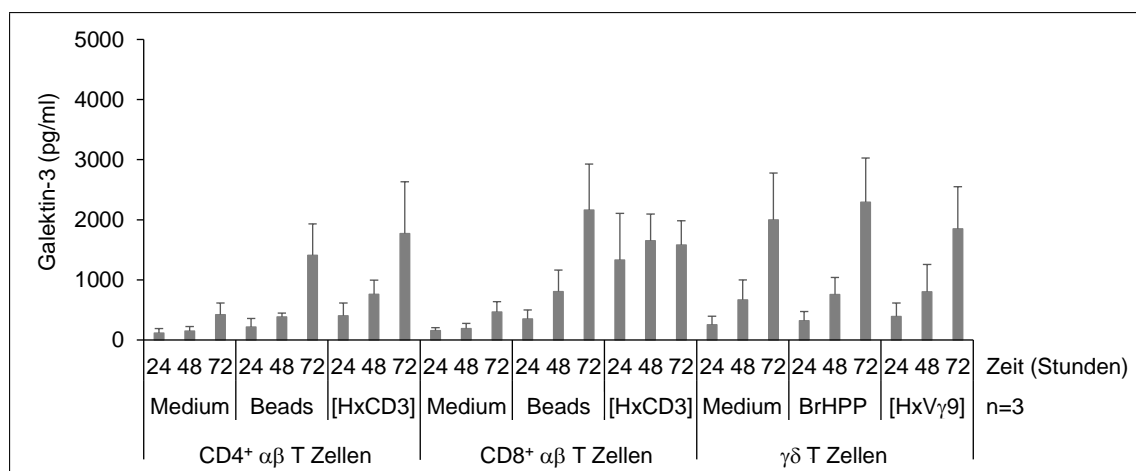
Insgesamt kann festgehalten werden, dass die freigesetzten Mengen an Galektin-3 sowohl durch Tumorzellen als auch durch frisch isolierte T Zellen bzw. kurzzeit aktivierte T Zelllinien allein verhältnismäßig gering waren.

#### 3.3.2 Einfluss der Kokultur von Tumorzellen und T Zellen auf die Freisetzung von Galektin-3 und Galektin-9

In Abschnitt 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass sowohl Tumorzellen als auch T Zellen allein nur sehr geringe Mengen Galektin-3 freisetzen. Dies könnte in Kokultur gänzlich anders sein, da hier die Freisetzung durch Bindung an Zelloberflächenmoleküle oder durch Freisetzung von Zytokinen induziert werden könnte. Da frisch isolierte T Zellen einen anderen Aktivierungsstatus als kurzzeit aktivierte T Zelllinien aufweisen, wurden PDAC Zellen einerseits mit frisch isolierten T Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen sowie  $\gamma\delta$  T Zellen), andererseits mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien kokultiviert, um die Galektin-3 Freisetzung in Kokultur genauer zu analysieren. Hierfür wurden ebenfalls die T Zellen bzw. kurzzeit aktivierten T Zelllinien derselben Spender aus Abschnitt 3.3.1 verwendet. Die Daten für die Kokultur mit PancTu-I Zellen und Panc1 Zellen als Beispiel für PDAC Zellen mit hoher und niedriger Galektin-3 Expression sind im Folgenden gezeigt. Die Daten von Kokulturen mit den weiteren PDAC Zellen Panc89 (niedrige Expression), Colo357 (mittlere Expression) und Capan-1 (hohe Expression) befinden sich in Abbildung 6.1 bis 6.6 im Anhang (Abschnitt 6.1 und 6.2). In den Kokulturen von PDAC Zellen mit T Zellen wurde ebenfalls Galektin-9 als Kontrolle im Zellkulturüberstand bestimmt. Diese Daten befinden sich ebenfalls im Anhang in Abbildung 6.7 bis 6.16 in Abschnitt 6.3 und 6.4.

In Abbildung 3.13 ist die Galektin-3 Menge im Zellkulturüberstand der Kokultur von PancTu-I Zellen mit frisch isolierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen sowie mit  $\gamma\delta$  T Zellen dargestellt. Interessanterweise wurden hier im Gegensatz zu der Kultur der entsprechenden Zellpopulationen alleine hohe Mengen Galektin-3 freigesetzt. In der Kokultur von PancTu-I Zellen mit

### 3 Ergebnisse

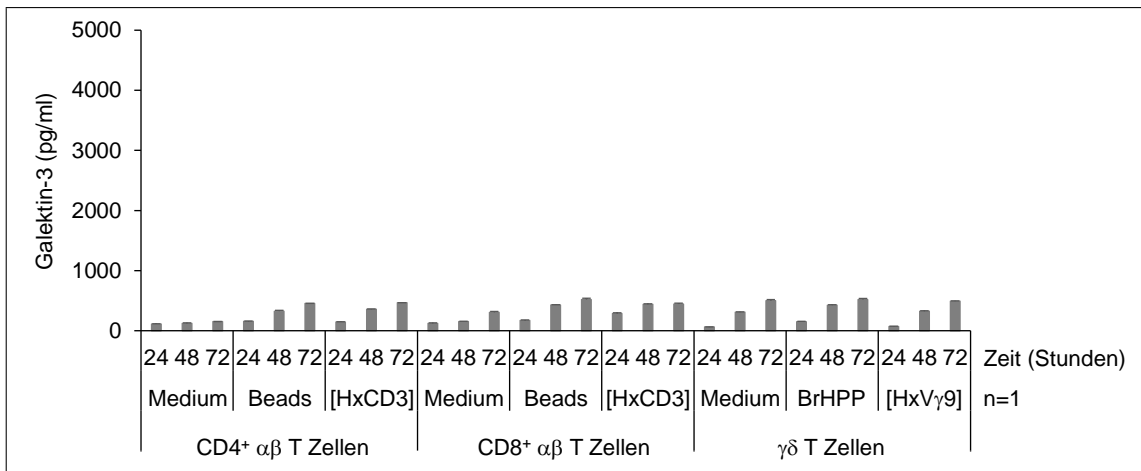


**Abbildung 3.13: In Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit PancTu-I Zellen werden hohe Mengen Galektin-3 freigesetzt.** 200.000 durch magnetische Separation isolierte CD4<sup>+</sup>αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup>αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden mit den entsprechenden Stimuli in Kokultur mit PancTu-I Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) und in Gegenwart von 50 IU IL-2 stimuliert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Überstände genommen und durch ELISA auf ihren Galektin-3 Gehalt überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von drei Spendern. Beads: αCD2, αCD3 und αCD28 markierte Partikel. [HxVγ9]: bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]. [HxCD3]: bsAk [HER2xCD3].

frisch isolierten γδ T Zellen wurden unabhängig von der Stimulation nach 24 Stunden ca. 250 pg/ml, nach 48 Stunden ca. 750 pg/ml und nach 72 Stunden ca. 1800-2200 pg/ml Galektin-3 im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Bei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen war die Galektin-3 Freisetzung abhängig von der Stimulation der T Zellen. Im Überstand von PancTu-I Zellen mit unstimulierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen (Medium) wurden nach 72 Stunden nur ca. 500 pg/ml Galektin-3 detektiert, während nach Stimulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (Beads) nach 72 Stunden ca. 1500 pg/ml (CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen) bzw. ca. 2200 pg/ml (CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen) Galektin-3 im Überstand der Kokultur nachgewiesen wurden. Wurden frisch isolierte CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen in Kokultur mit PancTu-I Zellen mit dem bsAk [HER2xCD3] aktiviert, war mit ca. 1800 pg/ml eine zur Aktivierung mit Beads ähnliche Galektin-3 Menge im Überstand nachweisbar. Bei Aktivierung von CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen mit [HER2xCD3] in Kokultur mit PancTu-I Zellen zeigte sich eine deutlich schnellere Freisetzung von Galektin-3. Nach 24 Stunden wurden bereits ca. 1300 pg/ml im Überstand nachgewiesen. Diese Menge stieg nach 48 und 72 Stunden nur noch leicht auf knapp über 1500 pg/ml an. Diese Beobachtungen konnten in Kokultur von denselben frisch isolierten T Zellen mit Capan-1 Zellen (ebenfalls hohe Galektin-3 Expression) bestätigt werden (Abbildung 6.3 im Anhang). Auch Galektin-9 wurde in Kokultur von PancTu-I Zellen mit frisch isolierten γδ T Zellen unabhängig vom Stimulus freigesetzt (Abbildung 6.7 im Anhang). Für die Freisetzung von Galektin-9 in Kokultur von PancTu-I Zellen mit frisch isolierten αβ T



### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen



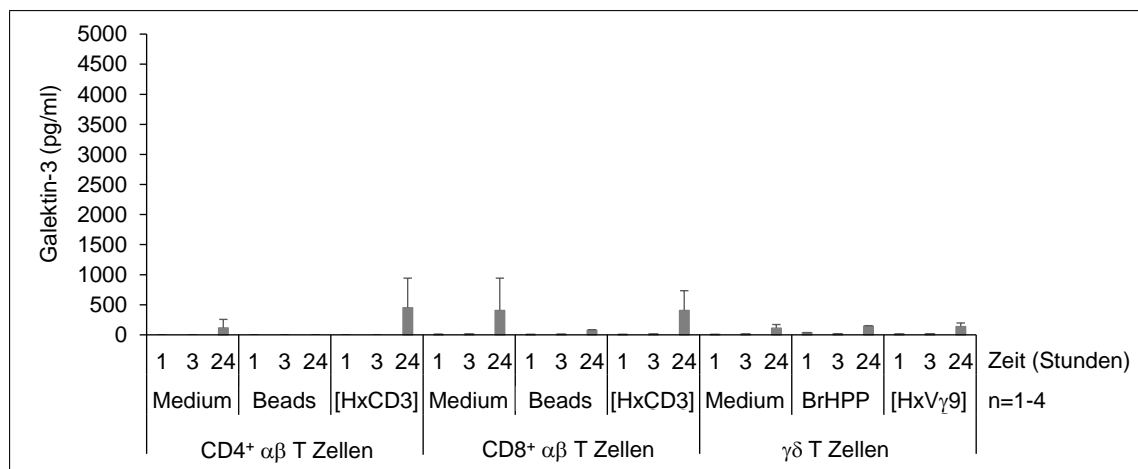
**Abbildung 3.14: Geringe Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Panc1 Zellen.** 200.000 magnetisch separierte CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden mit den angegebenen Stimuli stimuliert und mit Panc1 Zellen in Gegenwart von 50 IU IL-2 kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Zellkulturüberstände genommen und die Galektin-3 Menge mittels ELISA bestimmt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten eines Spenders. Beads: αCD2, αCD3 und αCD28 markierte Partikel. [HxVγ9]: bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]. [HxCD3]: bsAk [HER2xCD3].

Zellen war eine Stimulation der T Zellen notwendig. Allerdings zeigten sich hier nicht die für Galektin-3 beschriebenen Unterschiede zwischen der Stimulation von CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen mit Beads oder bsAk [HER2xCD3].

Im Gegensatz dazu wurden in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit PDAC Zellen, die eine geringe Galektin-3 Expression aufwiesen, deutlich geringere Mengen Galektin-3 freigesetzt. Sowohl in Kokultur mit Panc1 Zellen (Abbildung 3.14) als auch mit Panc89 Zellen (Abbildung 6.1 im Anhang) konnten nur Mengen von bis zu 500 pg/ml Galektin-3 im Überstand nachgewiesen werden. Allerdings bestätigten sich auch hier die in Kokulturen mit PancTu-I Zellen gemachten Beobachtungen, dass die Freisetzung bei γδ T Zellen unabhängig vom Stimulus ist, bei αβ T Zellen jedoch eine Stimulation der T Zellen für eine Galektin-3 Freisetzung wichtig ist. Auch der Unterschied zwischen der Stimulation von CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen mit Beads und bsAk ließ sich bei Kokultur mit Panc1 Zellen (und auch mit Panc89 Zellen) erneut beobachten. Unterschiede waren ebenfalls bei der Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Panc1 Zellen und Panc89 Zellen zu beobachten. In Kokultur mit Panc1 Zellen wurde kein Galektin-9 freigesetzt (Abbildung 6.10 im Anhang). Im Gegensatz dazu wurde in Kokultur mit Panc89 Zellen abhängig von Stimulation und T Zellpopulation ca. 400-600 pg/ml Galektin-9 freigesetzt (Abbildung 6.8 im Anhang).

Zusätzlich wurden kurzzeit aktivierte T Zelllinien aus den frisch isolierten T Zellen deselben Spender generiert und ebenfalls mit den PDAC Zellen Panc1, Panc89, Colo357, PancTu-I und

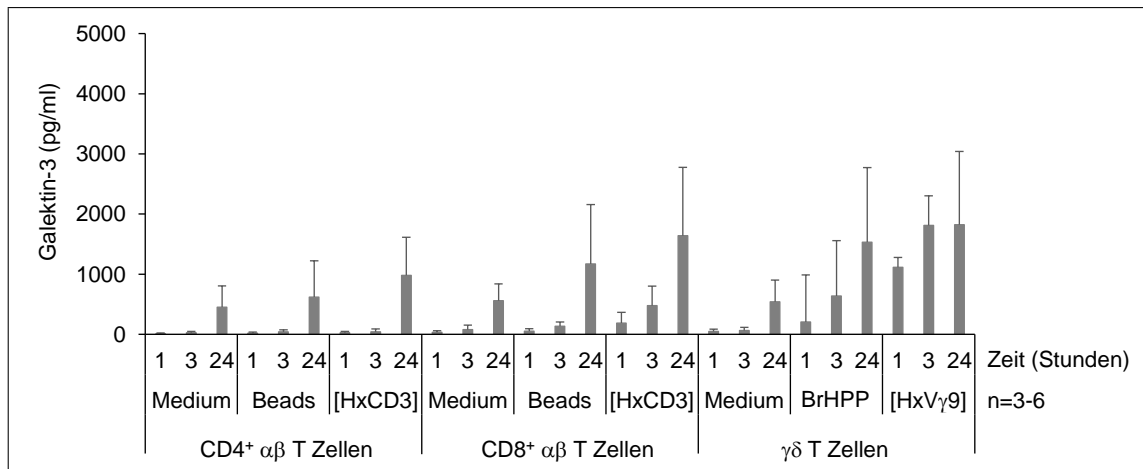
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.15: Wenig Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von Panc1 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen bzw. Vγ9Vδ2 γδ T Zellen wurden in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 mit Panc1 Zellen kokultiviert. Ein, drei und 24 Stunden nach Restimulation mit den angegebenen Stimuli wurden Zellkulturüberstände genommen und diese auf Galektin-3 überprüft (ELISA). Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von ein bis vier Spendern. Beads: αCD2, αCD3 und αCD28 markierte Partikel. [HxVγ9]: bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]. [HxCD3]: bsAk [HER2xCD3].

Capan-1 kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1 bzw. 20:1 bei Capan-1). Die nach ein, drei und 24 Stunden entnommenen Überstände wurden mit ELISA ebenfalls auf Galektin-3 und als Kontrolle auf Galektin-9 hin untersucht. Die Daten zur Kokultur mit Panc1- und PancTu-I Zellen als Beispiel für Zelllinien mit niedriger und hoher Galektin-3 Expression sind im Folgenden dargestellt. Die Daten der Galektin-3 Menge im Überstand der Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit den anderen PDAC Zellen befinden sich in Abschnitt 6.2 im Anhang. Die bestimmten Daten zur Galektin-9 Menge im Überstand der Kokulturen von PDAC Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien befinden sich ebenfalls im Anhang in Abschnitt 6.4. In der Kokultur von Panc1 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien (Abbildung 3.15) wurde wenig Galektin-3 freigesetzt, verglichen mit der Kokultur von Panc1 Zellen mit frisch isolierten T Zellen. In Kokultur von kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien mit Panc1 Zellen wurde im Überstand eine maximale Menge Galektin-3 von 150 pg/ml nach 24 Stunden detektiert. Dies war allerdings erneut unabhängig von der Art der Restimulation. In Kokultur von kurzzeit aktivierten CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen mit Panc1 Zellen konnte lediglich nach Restimulation mit dem bsAk [HER2xCD3] 500 pg/ml nach 24 Stunden im Überstand festgestellt werden, wohingegen in Kokultur von Panc1 Zellen mit nicht restimulierten CD4<sup>+</sup> kurzzeit aktivierten αβ T Zelllinien (Medium) nur ca. 100 pg/ml und mit Beads restimulierten CD4<sup>+</sup> kurzzeit aktivierten αβ T Zelllinien gar kein Galektin-3 detektiert werden konnte. Lediglich die Galektin-3 Menge in Kokultur von nicht restimulierten CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen mit Panc1 Zel-

### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen



**Abbildung 3.16: In Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit PancTu-I Zellen wird Galektin-3 freigesetzt.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen bzw. kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien wurden unterschiedlich restimuliert und mit PancTu-I Zellen in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1). Nach ein, drei und 24 Stunden wurden Zellkulturüberstände genommen und diese mittels ELISA auf Galektin-3 überprüft. Die Balken stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von drei bis sechs Spendern dar. Beads: αCD2, αCD3 und αCD28 markierte Partikel. [HxVγ9]: bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]. [HxCD3]: bsAk [HER2xCD3].

len war mit 500 pg/ml etwas höher als in der Kokultur mit CD4<sup>+</sup> αβ T Zelllinien. Ansonsten zeigte sich bei CD4<sup>+</sup> kurzzeit aktivierten αβ T Zelllinien ein sehr ähnliches Bild wie bei CD8<sup>+</sup> kurzzeit aktivierten αβ T Zelllinien. Galektin-9 konnte in Kokultur von Panc1 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien nur in Kokultur mit Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien nach Stimulation mit BrHPP detektiert werden (Abbildung 6.12 im Anhang). Ansonsten wurde kein Galektin-9 freigesetzt.

Auch in Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit PancTu-I Zellen (Abbildung 3.16) wurde Galektin-3 freigesetzt. Sowohl in Kokultur von PancTu-I Zellen mit CD4<sup>+</sup> als auch mit CD8<sup>+</sup> kurzzeit aktivierten αβ T Zelllinien wurde ca. 500 pg/ml Galektin-3 nach 24 Stunden freigesetzt, wenn die T Zellen nicht restimuliert waren. Wurden die T Zellen mit Beads restimuliert, erhöhte sich die Galektin-3 Menge im Überstand auf 600 pg/ml (CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen) bzw. 1100 pg/ml (CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen). Das meiste Galektin-3 konnte jedoch nach Restimulation der αβ T Zellen mit bsAk [HER2xCD3] detektiert werden (1000 pg/ml bei CD4<sup>+</sup> bzw. 1600 pg/ml bei CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen). Im Unterschied zur Kokultur von PancTu-I Zellen mit frisch isolierten γδ T Zellen mussten kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 T Zelllinien in der Kokultur von PancTu-I Zellen restimuliert werden, um größere Mengen Galektin-3 im Überstand zu detektieren. Nach Restimulation der kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zellen konnten schon nach drei Stunden 500 pg/ml Galektin-3 im Überstand gemessen werden, was sich nach 24 Stunden auf 1500 pg/ml steigerte. Wurden die Vγ9Vδ2 γδ T Zellen in Kokultur mit PancTu-I

### 3 Ergebnisse

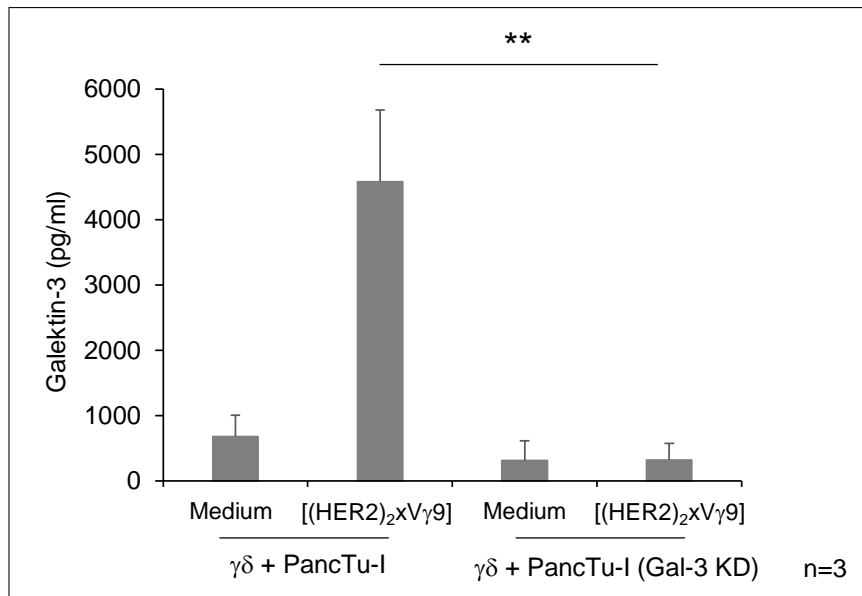
Zellen mit dem bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] restimuliert, waren schon nach einer Stunde 1100 pg/ml Galektin-3 im Überstand messbar. Dies erhöhte sich auf 1800 pg/ml nach drei Stunden und stieg danach nicht weiter. Galektin-9 wurde im Überstand der Kokultur von PancTu-I Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien in größeren Mengen nur nach Restimulation der T Zellen mit Beads ( $\alpha\beta$  T Zellen) oder mit Phosphoantigen ( $\gamma\delta$  T Zellen) freigesetzt (Abbildung 6.12 im Anhang). Interessanterweise war die Galektin-9 Menge in Kokultur mit kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 T Zelllinien (1000 pg/ml nach 24 Stunden) deutlich höher als bei kurzzeit aktivierten CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zelllinien (450 bzw. 280 pg/ml nach 24 Stunden). Diese Tendenz zeigte sich auch in Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit den anderen getesteten PDAC Zellen (Abbildungen in Abschnitt 6.4 im Anhang). In Kokultur mit Panc1 Zellen und Colo357 Zellen war die freigesetzte Galektin-9 Menge deutlich geringer, die oben beschriebene Tendenz blieb aber erhalten.

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass Galektin-3 zwar nur in geringen Mengen von PDAC Zellen und T Zellen alleine freigesetzt wurde, in Kokultur jedoch abhängig von der verwendeten PDAC Zelllinie hohe Mengen Galektin-3 freigesetzt wurden. In Kokultur mit frisch isolierten  $\alpha\beta$  T Zellen und weniger bei kurzzeit aktivierten  $\alpha\beta$  T Zelllinien war die Freisetzung von Galektin-3 abhängig von der Stimulation der T Zellen. Dies war interessanterweise in Kokultur mit frisch isolierten  $\gamma\delta$  T Zellen anders. Hier wurde Galektin-3 auch ohne Stimulation der T Zellen freigesetzt. Dies änderte sich, wenn statt frisch isolierten  $\gamma\delta$  T Zellen kurzzeit aktivierte  $\gamma\delta$  T Zelllinien verwendet wurden. Ähnlich wie bei  $\alpha\beta$  T Zellen war hier eine Restimulation notwendig um Galektin-3 im Überstand der Kokultur mit PDAC Zellen nachweisen zu können. Zusätzlich konnte eine Abhängigkeit der Galektin-3 Menge im Überstand mit der Galektin-3 Expression der Tumorzellen festgestellt werden. Es lässt sich also vermuten, dass Galektin-3 in Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen von den Tumorzellen freigesetzt wird. Auch Galektin-9 wurde in Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen abhängig der verwendeten PDAC Zelllinie oder T Zellpopulation und abhängig von der Stimulation der T Zellen freigesetzt.

#### 3.3.3 Galektin-3 in Kokultur wird von den Tumorzellen freigesetzt

In Abschnitt 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 in der Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen freigesetzt wird. In Kokultur der T Zellen mit PDAC Zellen mit niedriger Galektin-3 Expression wurde dabei weniger Galektin-3 freigesetzt als in Kokultur mit PDAC Zellen mit hoher Galektin-3 Expression. Dies legt die Vermutung nahe, dass das in der Kokultur freigesetzte Galektin-3 von den PDAC Zellen stammte. Um diese Hypothese zu beweisen,

### 3.3 Galektin-3 Freisetzung von PDAC Zellen und T Zellen



**Abbildung 3.17: Galektin-3 Freisetzung durch Tumorzellen.** 200.000 kurzzeit expandierte Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien wurden in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 mit untransfizierten PancTu-I Zellen oder mit PancTu-I Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert wurde (Gal-3 KD), kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) und mit dem bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] restimuliert oder in Medium kultiviert. Nach 24 Stunden wurden Überstände genommen und Galektin-3 mit ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der Galektin-3 Menge von Doppelwerten von drei Spendern ± Standardabweichung. Auf statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen, gepaarten Studentischen T-Test getestet. \*\*:p < 0,01.

wurde Galektin-3 in PancTu-I Zellen mit siRNA herunterreguliert und die Zellen anschließend exemplarisch mit kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1). Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände mit ELISA auf Galektin-3 überprüft. Wurden die kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien in der Kokultur mit untransfizierten PancTu-I Zellen nicht restimuliert, konnte erneut bestätigt werden, dass wie zu erwarten im Medium deutlich weniger Galektin-3 freigesetzt wurde als nach Restimulation mit dem bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] (700 pg/ml vs. 4600 pg/ml, Abbildung 3.17). Wurden die kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien mit PancTu-I Zellen kokultiviert, in denen Galektin-3 mit siRNA herunterreguliert war (Gal-3 KD), konnten sowohl nach Kultivierung in Medium als auch nach Restimulation mit bsAk 320 pg/ml Galektin-3 im Überstand gemessen werden. Die Verringerung der Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von PancTu-I Zellen mit kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien nach Herunterregulation von Galektin-3 in PancTu-I Zellen (4600 pg/ml in untransfizierten PancTu-I Zellen vs. 320 pg/ml in Gal-3 KD PancTu-I Zellen) ist hoch signifikant (p<0,01). Die Ergebnisse der drei Spender von kurzzeit aktivierten Vγ9Vδ2 γδ T Zelllinien in Abbildung 3.17 konnte auch in Kokultur mit kurzzeit aktivierten αβ T Zelllinien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Es kann also festgehalten werden, dass Galektin-3

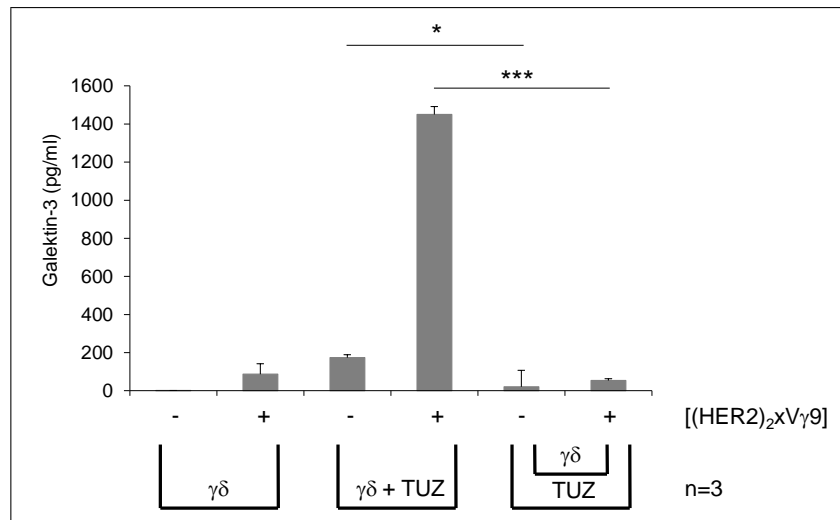
### 3 Ergebnisse

in Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen von den Tumorzellen freigesetzt wird.

#### 3.3.4 Galektin-3 Freisetzung in Kokultur ist zellkontaktabhängig

Galektin-3 wird nicht von PDAC Zellen alleine freigesetzt, sondern nur in Kokultur mit T Zellen. Um die Freisetzung von Galektin-3 durch die PDAC Zellen zu induzieren, könnten einerseits lösliche Faktoren der T Zellen, andererseits ein zellkontaktabhängiger Mechanismus eine Rolle spielen. Auch eine Kombination wäre möglich. Um die Zellkontaktabhängigkeit der Freisetzung von Galektin-3 zu überprüfen, wurden PancTu-I Zellen mit kurzzeit aktivierten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zelllinien kokultiviert und in einem Ansatz dabei durch die Membran eines *Transwell*-Einsatzes getrennt (Abbildung 3.18). Wurden die kurzzeit aktivierten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zelllinien alleine kultiviert, wurden ausschließlich nach Restimulation mit dem bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] sehr geringe Mengen Galektin-3 freigesetzt. Wurden die kurzzeit aktivierten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zelllinien gemeinsam mit PancTu-I Zellen kokultiviert, wurden nach 24 Stunden 175 pg/ml Galektin-3 freigesetzt wenn die  $\gamma\delta$  T Zellen nicht restimuliert wurden, und 1450 pg/ml nach Restimulation der T Zellen mit [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9]. Wurden die beiden Zellpopulationen dagegen durch die 0,4  $\mu$ m Membran des *Transwell*-Einsatzes getrennt, wurde selbst nach Restimulation der  $\gamma\delta$  T Zellen nur noch ca. 50 pg/ml Galektin-3 freigesetzt (Abbildung 3.18). Hierbei war unerheblich, ob wie in der Abbildung dargestellt die  $\gamma\delta$  T Zellen oder wie im Bild nicht gezeigt die Tumorzellen im *Transwell*-Einsatz kultiviert wurden. Um zu überprüfen, ob auch die Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von PDAC Zellen mit  $\alpha\beta$  T Zellen zellkontaktabhängig ist, wurden ebenfalls PancTu-I Zellen und kurzzeit aktivierte CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zelllinien eines Spenders kokultiviert und dabei durch eine Membran separiert. Nach 24 Stunden wurde die freigesetzte Galektin-3 Menge im Zellkulturüberstand ebenfalls mit ELISA bestimmt. Auch in diesem Fall war die freigesetzte Galektin-3 Menge nach Separation beider Zellpopulationen deutlich reduziert (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich also festhalten, dass die Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen in Kokultur sowohl mit  $\gamma\delta$  T Zellen als auch mit  $\alpha\beta$  T Zellen zellkontaktabhängig ist. Es ist nicht auszuschließen, dass zusätzlich zum Zellkontakt auch von T Zellen freigesetzte lösliche Faktoren ergänzend notwendig sein könnten um eine Galektin-3 Freisetzung durch die Tumorzellen zu induzieren.

### 3.4 Einfluss von Galektin-3 auf die $\gamma\delta$ T Zell-vermittelte Lyse von PDAC Zellen



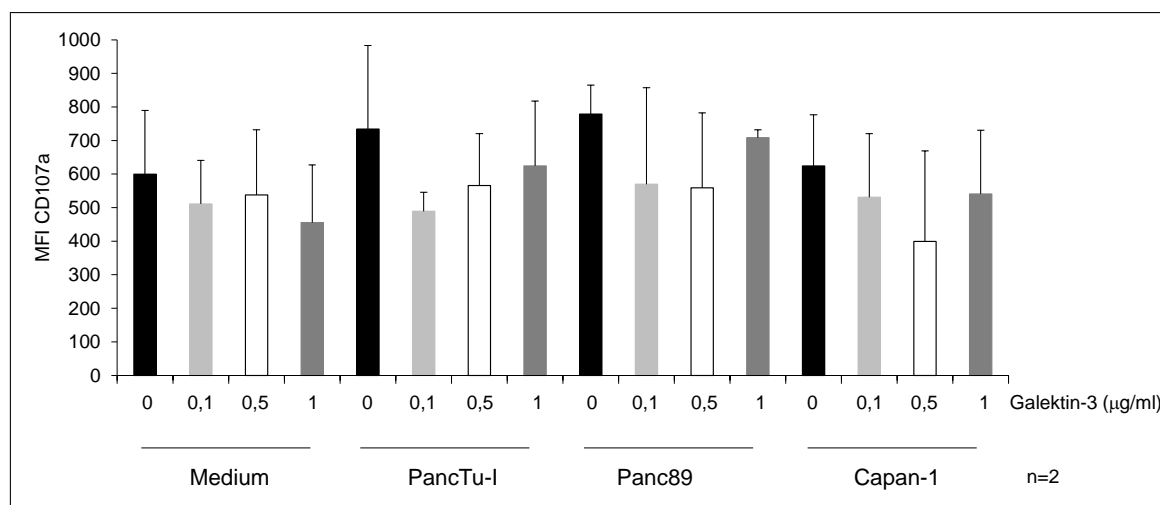
**Abbildung 3.18: Galektin-3 Freisetzung in Kokultur ist zellkontaktabhängig.** 20.000 PancTu-I Zellen wurden mit unstimulierten oder mit [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] restimulierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  kurzzeit T Zelllinien in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 kokultiviert (800.000, Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) und dabei in einigen Ansätzen von einer 0,4  $\mu$ m Membran separiert. Nach 24 Stunden wurde Galektin-3 im Zellkulturüberstand mit ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert von drei Spendern  $\pm$  Standardabweichung. Auf statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen, gepaarten Studentischen T-Test getestet. \*\*\*:p < 0,001; \*:p < 0,05.

### 3.4 Einfluss von Galektin-3 auf die $\gamma\delta$ T Zell-vermittelte Lyse von PDAC Zellen

Um die Funktionen des in Kokultur von PDAC Zellen und T Zellen durch die PDAC Zellen freigesetzten Galektin-3 auf die T Zellen näher zu betrachten, wurden zunächst zytotoxische Effektorfunktionen von  $\gamma\delta$  T Zellen auf PDAC Zellen mit unterschiedlicher Galektin-3 Expression analysiert. Als ein Marker für Degranulation diente das Markerprotein LAMP1 (CD107a). Dieses ist Bestandteil von sekretorischen Lysosomen, die nach Aktivierung an die Zelloberfläche gebracht werden und mit der Zellmembran verschmelzen. Dabei wird CD107a transient an der Zelloberfläche exprimiert. Dies kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Dabei geht eine Zunahme von CD107a an der Zelloberfläche z.B. mit einer Abnahme von intrazellulärem Perforin, welches in diesen Vesikeln gespeichert ist, einher (Betts et al., 2003; Krzewski et al., 2013).

Nach Restimulation von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien wurde eine hohe CD107a Expression auf der Zelloberfläche der  $\gamma\delta$  T Zellen gemessen (Abbildung 3.19). Diese war in Kokultur mit Capan-1 Zellen auf dem gleichen Niveau (MFI ca. 600), erhöhte sich in Kokultur mit PancTu-I (MFI 730) oder Panc89 (MFI 780) Zellen leicht (schwarze Balken). Bei Zugabe von Galektin-3 in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ g/ml (hellgraue Balken), 0,5  $\mu$ g/ml (wei-

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.19: CD107a Expression auf T Zellen nach Galektin-3 Zugabe.** 200.000 kurzzeit aktivierte  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zelllinien wurden 16 Tage nach initialer Stimulation mit 300nM BrHPP restimuliert und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Galektin-3 und eines Ak gegen CD107a für vier Stunden mit PancTu-I-, Panc89- oder Capan-1 Zellen mit einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 40:1 kokultiviert. Nach einer Stunde wurde  $3 \mu M$  Monensin hinzugefügt. Nach Ende der Kokultur wurden die Zellen mit dem anti-TZR  $V\gamma 9$  mAk 7A5 markiert und die CD107a Expression durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI)  $\pm$  Standardabweichung von zwei Spendern.

ße Balken) oder  $1 \mu g/ml$  (dunkelgraue Balken) verringerte sich die CD107a Expression leicht. Die mittlere Fluoreszenzaktivität bei kurzzeit aktivierten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen lag bei 600 ohne Galektin-3 und war in Gegenwart von Galektin-3 auf 510 ( $0,1 \mu g/ml$  Galektin-3) bzw. 540 ( $0,5 \mu g/ml$  Galektin-3) oder 455 ( $1 \mu g/ml$  Galektin-3) reduziert. Auch in Kokultur mit PancTu-I Zellen oder Capan-1 Zellen, die eine hohe Galektin-3 Expression aufwiesen und ebenfalls Galektin-3 in Kokultur freisetzen, reduzierte zusätzliches rekombinantes Galektin-3 die CD107a Expression. Bei Capan-1 Zellen ließ sich von  $0,1 \mu g/ml$  Galektin-3 auf  $0,5 \mu g/ml$  Galektin-3 eine konzentrationsabhängige Abnahme der CD107a Expression beobachten, diese stieg allerdings bei Zugabe von  $1 \mu g/ml$  Galektin-3 wieder etwas an. In Kokultur mit PancTu-I Zellen war keine konzentrationsabhängige Abnahme der CD107a Expression zu beobachten. Auch bei Panc89 Zellen, die eine geringe Galektin-3 Expression besitzen, führte die Zugabe von rekombinantem Galektin-3 zu einer leichten Reduktion der CD107a Expression. Insgesamt lässt sich festhalten, dass rekombinantes Galektin-3 sowohl bei kurzzeit aktivierten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen allein als auch in Kokultur mit PDAC Zellen unabhängig von der Galektin-3 Expression der PDAC Zellen zu einer geringfügigen Reduktion der CD107a Expression führte. Diese Reduktion der CD107a Expression korrelierte allerdings nicht mit der Konzentration des zugegebenen Galektin-3.

Um Aussagen treffen zu können, ob Galektin-3 eine Rolle bei der Modulation der zytotoxi-

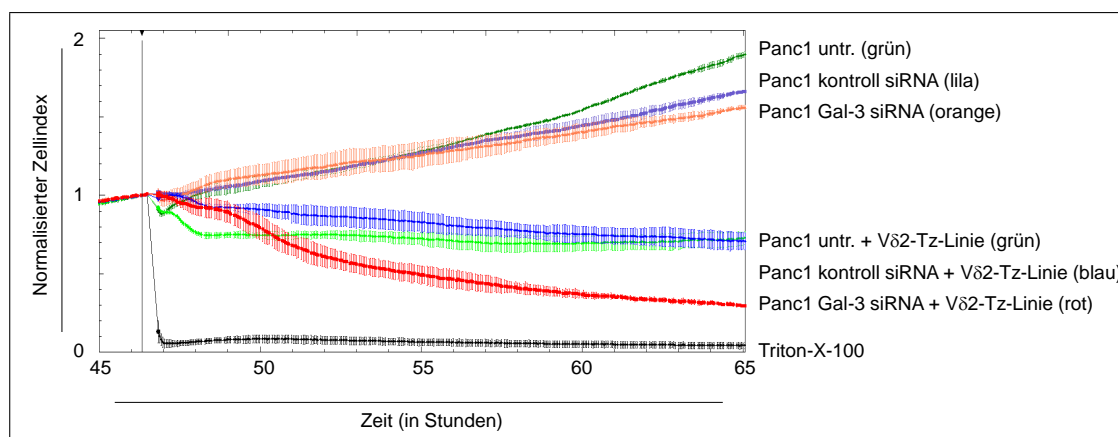


### 3.4 Einfluss von Galektin-3 auf die $\gamma\delta$ T Zell-vermittelte Lyse von PDAC Zellen

schen Aktivität von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen spielt, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Zur Analyse des Einflusses von rekombinantem Galektin-3 auf die zytotoxische Aktivität von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien, wurden verschiedene PDAC Zellen ausgesät und für 24-48 Stunden wachsen gelassen bis die Zellen eine lineare Wachstumsphase und einen Zellindex von ungefähr eins erreicht hatten. Anschließend wurden kurzzeit aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien mit rekombinantem Galektin-3 in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und die T Zellen mit bsAk restimuliert oder nicht. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von rekombinantem Galektin-3 im Gegensatz zu rekombinantem Galektin-9 keinerlei Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen unabhängig von der verwendeten PDAC Zelllinie hat (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde der Effekt des endogenen Galektin-3 der PDAC Zellen untersucht. Hierzu wurden Panc1 Zellen als Beispiel einer Zelllinie mit geringer Galektin-3 Expression und PancTu-I Zellen als Beispiel einer Zelllinie mit hoher Galektin-3 Expression mit kontroll siRNA oder mit siRNA gegen Galektin-3 transfiziert oder untransfiziert für 72 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und in 96er E-Platten erneut ausgesät. Untransfizierte (grüne Linien), mit kontroll siRNA transfizierte (lila und blaue Linie) und mit siRNA gegen Galektin-3 transfizierte (orange und rote Linie) Panc1 Zellen zeigten ein weitgehend vergleichbares Wachstum (Abbildung 3.20). Die Zugabe von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien führte zu einer Verringerung des Zellindex und damit einer Lyse der Panc1 Zellen. Untransfizierte und mit kontroll siRNA transfizierte Panc1 Zellen wurden hierbei gleich gut lysiert. Eine leicht erhöhte zytotoxische Aktivität zeigten kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien jedoch gegenüber Panc1 Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert war. Dies konnte zusätzlich zu dem in Abbildung 3.20 gezeigten repräsentativen Spender für  $\gamma\delta$  T Zellen von vier weiteren Spendern gezeigt werden. Auch  $\alpha\beta$  T Zellen waren in der Lage Panc1 Zellen mit herunterreguliertem Galektin-3 leicht besser zu lysieren (Daten nicht gezeigt).

PancTu-I Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert wurde, adhärirten nach dem Trypsinieren nicht mehr in der E-Platte, sodass eine Analyse der zytotoxischen Aktivität von  $\gamma\delta$  T Zellen auf PancTu-I Zellen mit und ohne Galektin-3 im RTCA nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die zytotoxische Aktivität von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen auf die PDAC Zelllinien Panc1 und PancTu-I, in denen Galektin-3 herunterreguliert wurde, parallel mit einem  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätstest analysiert (Abbildung 3.21). Die Daten eines repräsentativen Spenders von dreien sind in a)-d) dargestellt. In e) und f) sind die Werte für alle drei Spender bei einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 50:1 zusammengefasst dargestellt. Für Panc1 Zellen konnten die Daten aus dem RTCA auch im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest

### 3 Ergebnisse

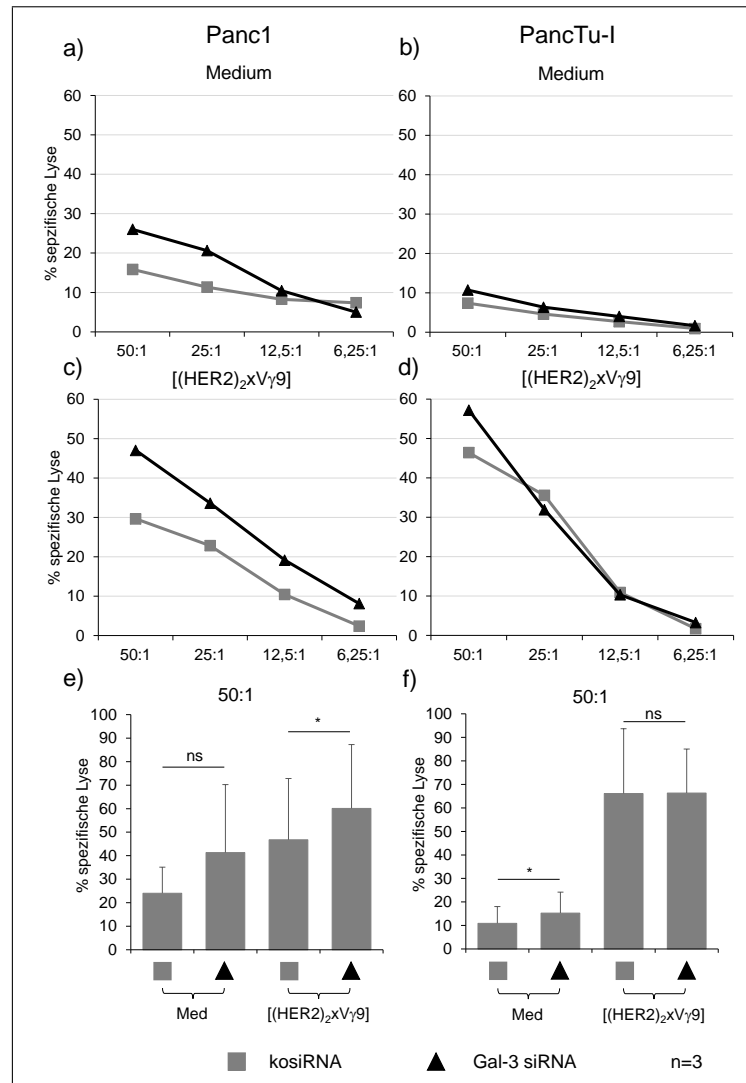


**Abbildung 3.20: Die Herunterregulation von Galektin-3 verbessert die  $\gamma\delta$  T Zell-vermittelte Lyse von Panc1 Zellen leicht.** 5000 untransfizierte (grün), mit kontroll siRNA transfizierte (lila, blau) oder mit Galektin-3 siRNA transfizierte (orange, rot) Panc1 Zellen wurden in 96er E-Plates im RTCA ausgesät. Nach 48 Stunden wurden  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zelllinien (Effektor-Zielzell-Verhältnis 25:1) (grüne, blaue oder rote Linie) oder Triton-X-100 zur Induktion von maximaler Zellyse hinzugefügt. Zum Angleich des initialen Wachstums wurde der Zellindex zum Zeitpunkt der Zugabe der T Zellen normalisiert und alle drei Minuten für 20 Stunden gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Triplikaten eines repräsentativen von fünf Spendern.

bestätigt werden. Nicht restimulierte kurzzeit aktivierte  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen lysierten Panc1 Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert war, bei einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 50:1 und 25:1 leicht besser als mit kontroll siRNA transfizierte Panc1 Zellen (Abb. 3.21, a). Dieser Effekt war bei geringeren Effektor-Zielzell-Verhältnissen allerdings nicht mehr zu beobachten. In der Zusammenfassung dreier Spender war auch bei einem Effektor-Zielzell-Verhältnis eine leichte Tendenz zu beobachten, dass Panc1 Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert war, leicht besser lysiert wurden, dies war aber nicht signifikant (Abb. 3.21, e). Wurden die  $\gamma\delta$  T Zellen mit bsAk restimuliert, zeigte sich im  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätstest eine verbesserte Lyse von Panc1 Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert war (Abb. 3.21, c bzw. e). Diese Daten konnten im RTCA jedoch mit fünf Spendern nicht bestätigt werden. Hier hatte die Herunterregulation von Galektin-3 in Panc1 Zellen keinen Einfluss auf die Lyse durch  $\gamma\delta$  T Zellen (Daten nicht gezeigt). PancTu-I Zellen wurden durch nicht restimulierte kurzzeit aktivierte  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen unabhängig von der Galektin-3 Expression nur in sehr geringem Maße lysiert (Abb. 3.21, b). Wurden die kurzzeit aktivierten  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen hingegen mit bsAk restimuliert, wurden PancTu-I Zellen deutlich stärker lysiert, wobei kein Unterschied zwischen PancTu-I Zellen, in denen Galektin-3 herunterreguliert war, und mit kontroll siRNA transfizierten PancTu-I Zellen festgestellt werden konnte (Abb. 3.21, d und f).

Die Zugabe von rekombinantem Galektin-3 reduzierte die Expression des Degranulationsmarkers CD107a leicht, was auf eine möglicherweise veränderte Degranulation von  $\gamma\delta$  T Zellen hindeuten könnte. Ein Effekt von rekombinantem Galektin-3 auf die zytotoxische Aktivität

### 3.4 Einfluss von Galektin-3 auf die $\gamma\delta$ T Zell-vermittelte Lyse von PDAC Zellen



**Abbildung 3.21: Geringer Effekt eines Galektin-3 Knockdowns auf die Lyse von PDAC Zellen.** Panc1- und PancTu-I Zellen wurden mit kontroll siRNA und Galektin-3 siRNA transfiziert und anschließend in einem fünfständigen <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest verwendet. (a-d) Killkurven mit Triplikaten von Vγ9Vδ2  $\gamma\delta$  T Zellen eines repräsentativen Spenders, die mit bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9] restimuliert oder in Medium kultiviert wurden. Die Standardabweichung war kleiner als 10 % und wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. (e,f) Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Effektor-Zielzellverhältnisses von 50:1 mit Vγ9Vδ2  $\gamma\delta$  T Zellen von drei Spendern. Auf statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen, gepaarten Studentischen T-Test getestet. \*:p < 0,05; ns: nicht signifikant.

### 3 Ergebnisse

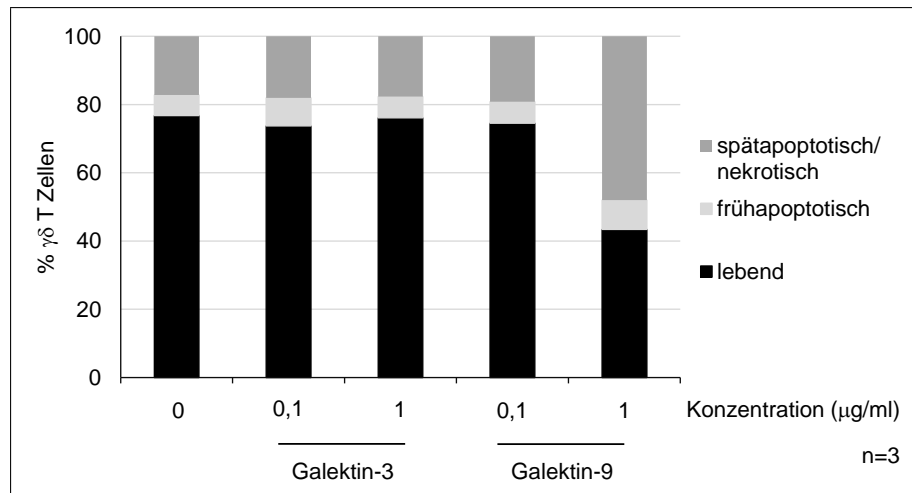
von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen ließ sich hingegen nicht beobachten. Auch die Herunterregulation von Galektin-3 in PDAC Zellen veränderte die zytotoxische Aktivität von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen nur geringfügig. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Galektin-3 keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen besitzt.

## 3.5 Galektin-9 jedoch nicht Galektin-3 induziert Zelltod in $\gamma\delta$ T Zellen

Eine Inhibition der Lyse von PDAC Zellen durch Galektin-3 könnte über die Induktion von Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen vermittelt werden. Fukumori et al. (2003) konnten zeigen, dass Galektin-3 in MOLT-4 und Jurkat T Zellen Apoptose induziert. Um zu überprüfen, ob Galektin-3 auch in  $\gamma\delta$  T Zellen Apoptose induziert, wurden kurzzeit aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen Galektin-3 behandelt. Als Kontrolle wurden dieselben  $\gamma\delta$  T Zellen mit Galektin-9 behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Induktion von Apoptose durch Markierung mit Annexin-V sowie durch Zugabe von Propidiumiodid (PI) überprüft. Die Markierung mit Annexin-V diente hierbei als ein Marker für apoptotische Zellen, wohingegen die Aufnahme von PI in die Zellen als Indikator für spätapoptotische oder nekrotische Zellen diente. In Abbildung 3.22 ist der Anteil lebender (Annexin-V<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>), frühapoptotischer (Annexin-V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) sowie spätapoptotischer/nekrotischer (Annexin-V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) Zellen eines Spenders dargestellt. Ohne Zugabe von Galektinen waren 77% der  $\gamma\delta$  T Zellen lebend, 6% apoptotisch sowie 17% spätapoptotisch/nekrotisch. 24 Stunden nach Zugabe von 0,1  $\mu$ g/ml oder 1  $\mu$ g/ml Galektin-3 waren diese Werte nahezu unverändert. Auch die Inkubation der kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen mit 0,1  $\mu$ g/ml Galektin-9 beeinflusste die Vitalität der Zellen nicht. 24 Stunden nach Kultivierung der  $\gamma\delta$  T Zellen mit einer höheren Konzentration von 1  $\mu$ g/ml Galektin-9 war die Anzahl der lebenden  $\gamma\delta$  T Zellen jedoch deutlich auf 43% reduziert. Der Anteil toter bzw. sterbender  $\gamma\delta$  T Zellen war mit 9% (apoptotisch) bzw. 48% (spätapoptotisch) entsprechend deutlich erhöht. Diese Ergebnisse wurden durch zusätzliche Messungen mit weiteren kurzzeit aktivierten  $\gamma\delta$  T Zellen mehrerer Spender, in denen nur mit PI gefärbt wurde und somit keine Unterscheidung zwischen apoptotischen und spätapoptotischen Zellen möglich ist, bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Es kann also festgehalten werden, dass Galektin-3 in den verwendeten Konzentrationen im Unterschied zu Galektin-9 keinen Zelltod in T Zellen induziert.

### 3.6 Galektin-3 inhibiert die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen

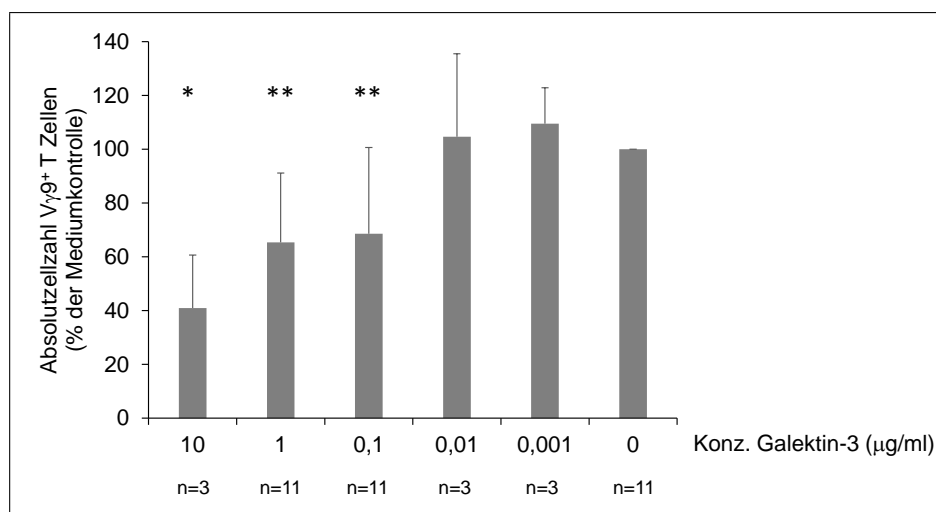


**Abbildung 3.22: Galektin-9 und nicht Galektin-3 induziert Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen.** 100.000 kurzzeitig aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Galektin-3 oder Galektin-9 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI) markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Anteil lebender (Annexin-V<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>), frühapoptotischer (Annexin-V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) und spätapoptotischer/nekrotischer (Annexin-V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) Zellen als Mittelwert von drei Spendern. Die Standardabweichung war in allen Fällen kleiner als 10%.

### 3.6 Galektin-3 inhibiert die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen

Da eine Induktion von Zelltod durch die eingesetzten Galektin-3 Konzentrationen ausgeschlossen werden konnte, wurde überprüft, inwiefern die  $\gamma\delta$  T Zellproliferation durch Galektin-3 beeinflusst wird. Hierzu wurden PBMZ in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Galektin-3 sowie von IL-2 mit BrHPP stimuliert. Nach sechs oder sieben Tagen wurde die  $\gamma\delta$  T Zellproliferation mit SCDA, einer im Labor etablierten Methode zur Bestimmung der Absolutzellzahl, bestimmt. Die Daten wurden zur Angleichung der Unterschiede zwischen unterschiedlichen Spendern auf die Kontrolle ohne Zugabe von Galektin-3 (Medium) normalisiert und in Abbildung 3.23 dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, reduzierte die Zugabe von rekombinantem Galektin-3 die Proliferationskapazität der  $\gamma\delta$  T Zellen und führte zu deutlich niedrigeren Absolutzellzahlen. Bei Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 proliferierten nur 41 % der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (ohne Galektin-3). War 1  $\mu\text{g/ml}$  oder 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 zugegeben, proliferierten immerhin noch 65 % bzw. 68 % der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  und 0,001  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3 hatten keinen Einfluss mehr auf die Proliferation der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen. Die Reduktion der Proliferation ist hoch signifikant (1  $\mu\text{g/ml}$  oder 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3) oder signifikant (10  $\mu\text{g/ml}$  Galektin-3).

### 3 Ergebnisse

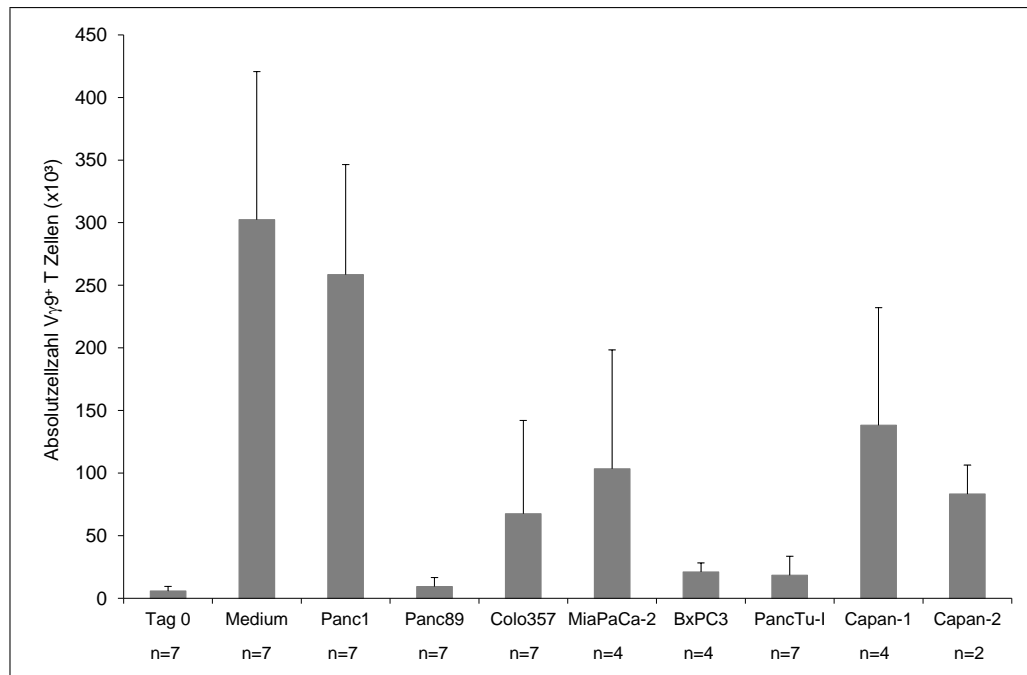


**Abbildung 3.23: Inhibition der  $\gamma\delta$  T Zellproliferation innerhalb der PBMZ durch Galektin-3.** 125.000 PBMZ wurden in 96er Rundbodenplatten ausplattiert und mit 300nM BrHPP in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von rekombinantem Galektin-3 und 50 IU IL-2 stimuliert. Nach 6-7 Tagen wurde die Absolutzellzahl als prozentualer Anteil der Mediumkontrolle der  $V\gamma 9$ -positiven  $\gamma\delta$  T Zellen mittels SCDA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten von drei bzw. elf Spendern. Auf statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen, gepaarten Studentischen T-Test getestet: \*\*:p < 0,01; \*:p < 0,05.

## 3.7 Die Mehrzahl der PDAC Zellen inhibiert die Proliferation von T Zellen

In den folgenden Experimenten wurde überprüft, ob die  $\gamma\delta$  T Zellproliferation von stark Galektin-3 exprimierenden PDAC Zellen im Vergleich zu schwach Galektin-3 exprimierenden PDAC Zellen eingeschränkt ist. Panc1-, Panc89-, Colo357-, MiaPaCa-2-, BxPC3-, PancTu-I-, Capan-1- oder Capan-2 Zellen wurden in 96er Flachbodenplatten ausplattiert und adhärerten für 24 Stunden. Anschließend wurden PBMZ hinzugefügt und mit Zoledronat in der Gegenwart von IL-2 stimuliert. Nach 6-7 Tagen wurde die Proliferation anhand der Absolutzellzahl der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen mit SCDA gemessen. Als Kontrolle diente die Absolutzellzahl von  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen in Abwesenheit von PDAC Zellen. Wie in Abbildung 3.24 dargestellt, war die Absolutzellzahl von 5800 an Tag 0 auf knapp 300.000  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen am Tag der Messung gestiegen, wenn diese in Abwesenheit von PDAC Zellen (Medium) expandiert wurden. Fand die Expansion in Kokultur mit Panc1 Zellen statt, reduzierte sich die gemessene Absolutzellzahl geringfügig auf 260.000  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen. Eine deutlich stärkere Reduktion der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl war in Kokultur mit Colo357- (67.500), MiaPaCa-2- (100.000), Capan-1- (140.000) und Capan-2 (83.000) Zellen zu beobachten. In Gegenwart der

### 3.8 Aus Tumorzellen freigesetztes Galektin-3 inhibiert die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen



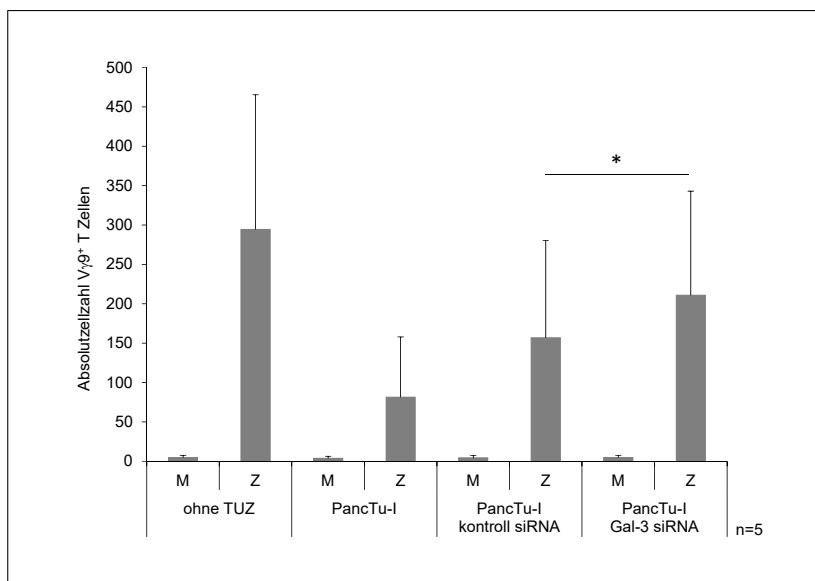
**Abbildung 3.24: Die Mehrzahl der PDAC Linien inhibiert die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ.** 5000 Panc1-, Panc89-, Colo357-, MiaPaCa-2-, BxPC3-, PancTu-I Zellen bzw. 10.000 Capan-1- oder Capan-2 Zellen wurden in 96er Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden 250.000 PBMZ (Effektor-Zielzell-Verhältnis 50:1 bzw. 25:1) hinzugefügt und mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat in Gegenwart von 50 IU IL-2 stimuliert. Nach 6-7 Tagen wurde die Proliferation der V $\gamma$ 9-positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen über eine veränderte Absolutzellzahl mit SCDA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten von zwei bis sieben Spendern.

PDAC Zellen Panc89, BxPC3 und PancTu-I proliferierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen nicht. In Kokultur mit Panc89 Zellen waren lediglich 9400, mit BxPC3 Zellen 21.000 und in Kokultur mit PancTu-I 18.000 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen am Tag der Messung nachweisbar. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen proliferierten in Abwesenheit von PDAC Zellen deutlich besser als in Kokultur mit PDAC Zellen. Nur in Gegenwart von Panc1 Zellen war eine Proliferation von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen gut möglich.

### 3.8 Aus Tumorzellen freigesetztes Galektin-3 inhibiert die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen

Zur Analyse, ob Galektin-3, das aus PDAC Zellen in Kokultur mit T Zellen freigesetzt wird, für die Proliferationsinhibition von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen verantwortlich ist, wurde die Proliferation in Kokultur mit PancTu-I Zellen, in denen Galektin-3 mit siRNA herunterreguliert wurde,

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.25: Herunterregulation von Galektin-3 in PancTu-I Zellen stellt die Proliferationsfähigkeit von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ in Kokultur teilweise wieder her.** 5000 untransfizierte PancTu-I Zellen oder mit kontroll siRNA oder Galektin-3 siRNA transfizierte PancTu-I Zellen (72 Stunden nach Transfektion) wurden in 96er Flachbodenplatten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden 250.000 PBMZ alleine kultiviert (ohne TUZ) oder zu den Tumorzellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 50:1) hinzugefügt und in Gegenwart von IL-2 unstimuliert gelassen (M) oder mit Zoledronat (Z) stimuliert. Nach sechs Tagen wurde die Absolutzellzahl der  $V\gamma 9$ -positiven  $\gamma\delta$  T Zellen mittels SCDA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten von fünf Spendern. Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde ein zweiseitiger, gepaarter Studentischer T-Test verwendet. \*:  $p < 0,05$ .

analysiert. Hierzu wurden PancTu-I Zellen untransfiziert kultiviert oder mit kontroll siRNA oder siRNA gegen Galektin-3 transfiziert. 5000 Tumorzellen wurden 72 Stunden nach Transfektion in 96er Flachbodenplatten ausplattiert und adhären für 24 Stunden bevor 250.000 PBMZ hinzugefügt und mit Zoledronat oder BrHPP in Gegenwart von IL-2 stimuliert wurden. Nach sechs Tagen wurde die  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl mit SCDA bestimmt (Abbildung 3.25). In Abwesenheit von PancTu-I Zellen (ohne TUZ) waren sechs Tage nach Stimulation mit Zoledronat in Gegenwart von IL-2 294.000  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen zu detektieren. Wurden die  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen in Anwesenheit von untransfizierten PancTu-I Zellen stimuliert, war die Absolutzellzahl der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen deutlich reduziert (81.500). Wurden die PancTu-I Zellen vor der Kokultur mit kontroll siRNA transfiziert, erhöhte sich die Absolutzellzahl der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen auf 156.500. Wurde vor der Kokultur Galektin-3 mit siRNA herunterreguliert, waren mit 210.500  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen eine signifikant erhöhte der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl im Vergleich zur Kokultur mit kontroll siRNA transfizierten PancTu-I Zellen nachweisbar. Auch nach Stimulation der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen mit BrHPP konnte nach sechs Tagen in Kokultur mit Galektin-3 siRNA transfizierten PancTu-I Zellen eine signifikant erhöh-



### 3.9 $\beta 1\alpha 3$ Integrin ist beteiligt an der Proliferationsinhibition

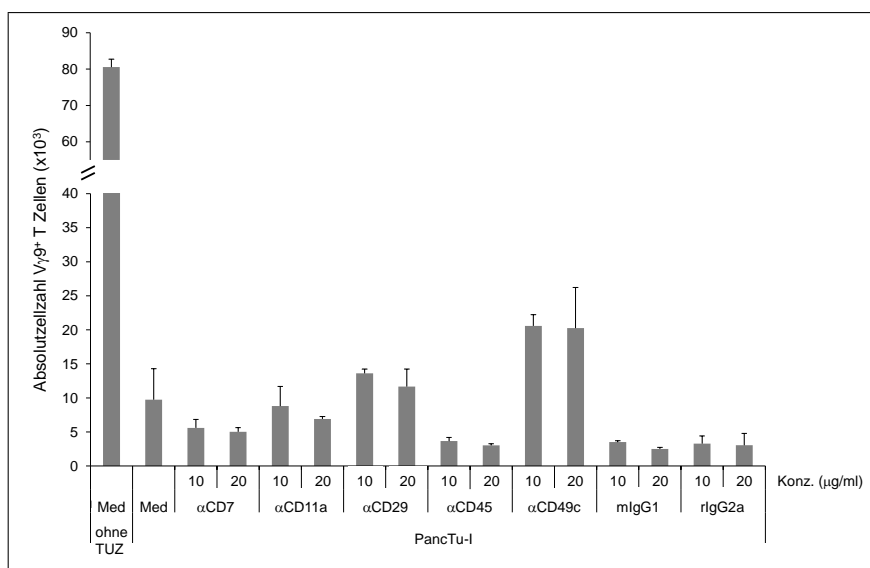
te  $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl im Vergleich zur Kokultur mit kontroll siRNA transfizierten PancTu-I Zellen gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Wurden PBMZ in Gegenwart von Panc1 Zellen, die vorher mit kontroll siRNA oder siRNA gegen Galektin-3 transfiziert wurden, mit BrHPP oder Zoledronat stimuliert, konnte keine Veränderung der Absolutzellzahl im Vergleich zur Stimulation in Anwesenheit von untransfizierten Panc1 Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zumindest in Kokultur mit PancTu-I Zellen scheint also Galektin-3 mitverantwortlich für die Proliferationsinhibition von  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen durch PDAC Zellen zu sein. Zwar konnte durch Herunterregulation von Galektin-3 die Absolutzellzahl nur auf ca. zwei Drittel der ohne PDAC Zellen erreichten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Absolutzellzahl erhöht werden, dies könnte aber auch an der nicht vollständigen Herunterregulation insbesondere über den langen Zeitraum der Expansion liegen. Bis zu fünf Tage nach Transfektion der siRNA blieb die Galektin-3 Expression auf konstant niedrigem Niveau, stieg danach allerdings langsam wieder an. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren eine Rolle bei der Proliferationsinhibition von  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen durch PancTu-I Zellen spielen können.

### 3.9 $\beta 1\alpha 3$ Integrin ist beteiligt an der Proliferationsinhibition

In Abschnitt 3.8 konnte gezeigt werden, dass von PDAC Zellen freigesetztes Galektin-3 die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen inhibiert. In der Literatur ist eine Bindung von Galektin-3 an verschiedene Proteine beschrieben, die auch für die Funktion von  $\gamma\delta$  T Zellen bzw. deren Interaktion mit PDAC Zellen wichtig sind (Dumic et al., 2006). Fukushi und Kollegen konnten z.B. eine Interaktion von Galektin-3 mit  $\beta 1\alpha 3$  Integrin (CD29/CD49c) nachweisen (Fukushi et al., 2004). Fukumori und Kollegen konnten unterstützend zeigen, dass hohe Konzentrationen Galektin-3 über eine Interaktion mit CD7 und CD29 Apoptose in T Zelllinien auslösen können (Fukumori et al., 2003). Zusätzlich zu diesen Molekülen wurden in den folgenden Experimenten weitere in Frage kommende Moleküle wie CD11a (Komponente von *lymphocyte function associated antigen 1*, LFA-1) und die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 analysiert, die u.a. bei der Aktivierung von T Zellen eine entscheidende Rolle spielen (zusammengefasst in Saunders and Johnson, 2010). Um eine mögliche Galektin-3 unabhängige Beteiligung dieser Proteine in der Proliferation von  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen zu analysieren, wurden PBMZ zunächst ohne PDAC Zellen mit Antikörpern gegen diese Proteine in den Konzentrationen  $10 \mu\text{g/ml}$  oder  $20 \mu\text{g/ml}$  für zwei Stunden vorinkubiert, bevor diese mit Zoledronat in Gegenwart von IL-2 stimuliert wurden. Am Tag der Stimulation (Tag 0) und nach sechs Tagen wurde die

### 3 Ergebnisse

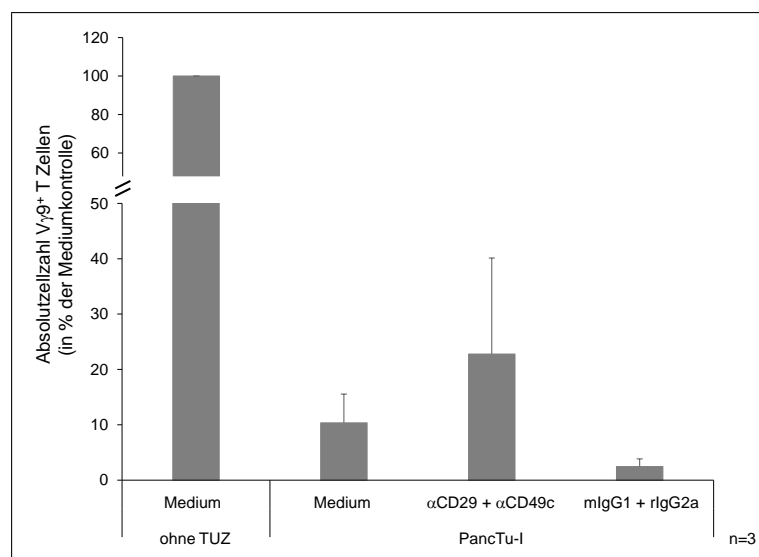


**Abbildung 3.26: CD29 und CD49c spielen eine Rolle bei der Galektin-3 vermittelten Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ.** 5000 PancTu-I Zellen wurden in 96er Flachbodenplatten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden 250.000 PBMZ in 110  $\mu$ l mit den angegebenen Antikörpern (10  $\mu$ g/ml und 20  $\mu$ g/ml) für zwei Stunden vorinkubiert und anschließend 50  $\mu$ l zu den Tumorzellen transferiert und mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat in Gegenwart von 50 IU IL-2 stimuliert. Nach sechs Tagen wurde die Absolutzellzahl der V $\gamma$ 9-positiven  $\gamma\delta$  T Zellen mit SCDA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten eines Spenders.

Absolutzellzahl der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen mit SCDA bestimmt. Wie in Abbildung 6.17 im Abschnitt 6.5 im Anhang ersichtlich wird, hatte schon allein die Vorinkubation der PBMZ mit den Isotypkontrollen (mIgG1 und rIgG2a) mit 10  $\mu$ g/ml oder 20  $\mu$ g/ml eine deutliche Reduktion der Absolutzellzahl der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen zur Folge. Nach Vorinkubation mit den spezifischen Antikörpern gegen CD7, CD11a, CD29, CD45 und CD49c war eine Reduktion der Absolutzellzahl um ca. 30 - 70% zu beobachten, wobei die Reduktion bei Antikörpern gegen CD7, CD11a und CD28 im Bereich der Isotypkontrollen lag, bei Antikörpern gegen CD45 und CD49c die Proliferation jedoch nicht ganz so stark eingeschränkt wurde.

Zusätzlich zu den Effekten der Antikörper auf die PBMZ alleine, wurde der Einfluss einer Vorinkubation von PBMZ mit den Antikörpern gegen CD7, CD11a, CD29, CD45 und CD49c in der Kokultur mit PancTu-I Zellen analysiert. Hierzu wurden die PBMZ wie bereits beschrieben für zwei Stunden vorinkubiert und anschließend zu den für 24 Stunden in 96er Flachbodenplatten ausplattierten PancTu-I Zellen gegeben und mit Zoledronat in Gegenwart von IL-2 stimuliert. Nach sechs Tagen wurden die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl bestimmt. Wie in Abbildung 3.26 ersichtlich wird, waren sechs Tage nach Stimulation der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen in Gegenwart von PancTu-I Zellen nur 10.000  $\gamma\delta$  T Zellen nachweisbar, im Vergleich zu 80.000  $\gamma\delta$  T Zellen nach Stimulation in Abwesenheit von PancTu-I Zellen. Wurden die

### 3.9 $\beta 1\alpha 3$ Integrin ist beteiligt an der Proliferationsinhibition



**Abbildung 3.27: Partielle Wiederherstellung der  $\gamma\delta$  T Zellproliferation nach PBMZ/PDAC Zell-Kokultur durch  $\alpha$ CD29/ $\alpha$ CD49c Ak-Kombination.** 5000 PancTu-I Zellen wurden in 96er Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden 250.000 PBMZ in 110  $\mu$ l mit  $\alpha$ CD29 und  $\alpha$ CD49c mAk oder den entsprechenden Isotypkontrollen (je 5  $\mu$ g/ml) für zwei Stunden vorinkubiert. 50  $\mu$ l dieses Zell-/Antikörper-Gemisches wurde anschließend zu den Tumorzellen gegeben und in Gegenwart von 50 IU IL-2 mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat stimuliert. Nach sieben Tagen wurde mit SCDA die V $\gamma 9$ V $\delta 2$   $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl bestimmt und auf die Mediumkontrolle in Abwesenheit von Tumorzellen (TUZ) normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten von drei Spendern.

PBMZ vor der Kokultur mit PancTu-I Zellen mit Antikörpern gegen CD7 oder CD45 oder mit mIgG1 oder rIgG2a Isotypkontrollen vorinkubiert, reduzierte sich die Absolutzellzahl weiter, was vermutlich auf die oben beschriebene proliferationsinhibierende Wirkung der Antikörper zurückzuführen ist. Wurden die PBMZ hingegen mit Antikörpern gegen  $\beta 1$ -Integrin (CD29) oder  $\alpha 3$ -Integrin (CD49c) vorinkubiert, erhöhte sich die Absolutzellzahl der V $\gamma 9$ V $\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen im Vergleich zu nicht vorinkubierten PBMZ in Kokultur mit PancTu-I Zellen leicht (CD29, 13.000  $\gamma\delta$  T Zellen) oder deutlich (CD49c, 20.000  $\gamma\delta$  T Zellen). Insbesondere das  $\beta 1\alpha 3$  Integrin scheint also eine Rolle bei der Galektin-3 vermittelten Proliferationsinhibition von V $\gamma 9$ V $\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen durch PDAC Zellen zu spielen.

Um diese mit einem repräsentativen Spender gewonnenen Erkenntnisse (Abbildung 3.26) zu verifizieren, wurde die Kombination von Antikörpern gegen CD29 und CD49c zur Aufhebung der Proliferationsinhibition verwendet. Wurden PBMZ von drei Spendern mit der Kombination der Antikörper gegen CD29 und CD49c zur Reduktion der insgesamt verwendeten Antikörpermenge in Konzentrationen von je 5  $\mu$ g/ml vorinkubiert und anschließend in Gegenwart von PancTu-I Zellen mit Zoledronat und IL-2 stimuliert, konnte die aus Abbildung 3.26 gezogene Vermutung bestätigt werden. Auch die Vorinkubation mit der Kombination der Antikörper

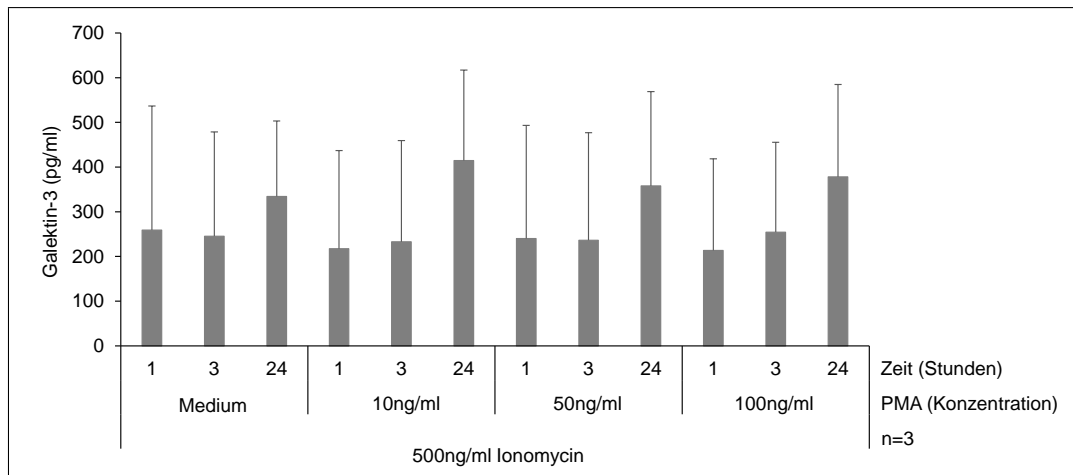
### 3 Ergebnisse

gegen CD29 und CD49c hob die Proliferationsinhibition durch PancTu-I Zellen teilweise auf. Allerdings steigerte die Kombination beider Antikörper die Proliferation der  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen in Kokultur nicht deutlich stärker als die Vorinkubation mit  $\alpha$ CD49c-Antikörper allein, was darauf hindeutet, dass möglicherweise  $\alpha 3$ -Integrin eine größere Rolle bei der Galektin-3 vermittelten Proliferationsinhibition durch PancTu-I Zellen spielt als  $\beta 1$ -Integrin. Es ist außerdem zu vermuten, dass noch weitere Moleküle an der Proliferationsinhibition von  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen durch PancTu-I Zellen beteiligt sind.

### **3.10 Galektin-3 wird durch PDAC Zellen in Kokultur mit T Zellen in die Zellperipherie relokalisiert**

In Abschnitt 3.3.4 konnte bereits gezeigt werden, dass die Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen in Kokultur mit T Zellen von direktem Zell-Zell-Kontakt beider Zellpopulationen abhängt. In den im Folgenden dargestellten Versuchen sollte nun der Mechanismus der Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen aufgeklärt werden. Hierfür wurde zunächst analysiert, ob eine Aktivierung des  $Ca^{2+}$ - oder des Protein-Kinase-C (PKC)-Signalwegs für die Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen notwendig ist. PancTu-I Zellen wurden deshalb mit dem  $Ca^{2+}$ -Ionophor Ionomycin (Liu and Hermann, 1978) und dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), der ein Aktivator der PKC ist (Castagna et al., 1982), aktiviert. Nach ein, drei und 24 Stunden wurde die Freisetzung von Galektin-3 in den Überstand mit ELISA analysiert. Wie in Abbildung 3.28 dargestellt ist, veränderte sich die durch PancTu-I Zellen alleine (Medium) nach einer oder drei Stunden freigesetzte Menge Galektin-3 durch Stimulation mit Ionomycin und PMA nur wenig. Lediglich nach Stimulation von Ionomycin (500 ng/ml) und PMA mit 10 ng/ml war nach 24 Stunden eine leicht erhöhte Menge Galektin-3 im Überstand nachzuweisen. Allerdings lag die freigesetzte Menge Galektin-3 weit von den in Kokultur freigesetzten Mengen (Abschnitt 3.3.2) entfernt. Eine weitere Möglichkeit die Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen zu induzieren, könnte die Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen PDAC Zellen und  $\gamma\delta$  T Zellen während deren Interaktion sein. Um dies zu analysieren, wurden PancTu-I Zellen mit kurzzeit aktivierten  $V\gamma 9V\delta 2 \gamma\delta$  T Zellen für ein, drei, fünf, zehn, 20 und 45 Minuten kokultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellkonjugate fixiert und für die Bestimmung am Imagestream<sup>X</sup> MKII markiert. Hierbei wurde CD3 als Marker für T Zellen und das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) als Marker für PancTu-I Zellen verwendet. Um die Ausbildung einer Synapse nachweisen zu kön-

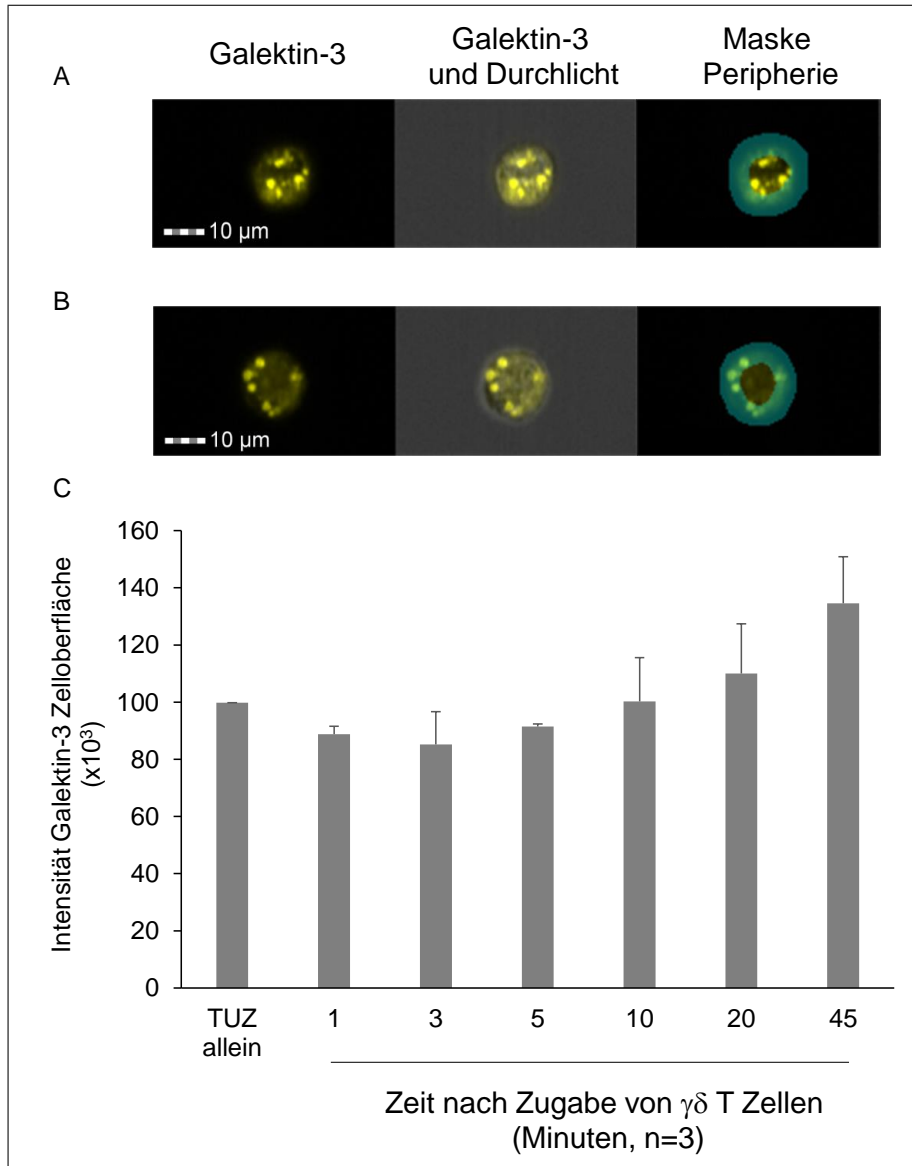
### 3.10 Galektin-3 wird durch PDAC Zellen in Kokultur mit T Zellen in die Zellperipherie relokalisiert



**Abbildung 3.28: Galektin-3 Freisetzung durch PDAC Zellen ist unabhängig vom  $\text{Ca}^{2+}$ - oder PKC-Signalweg.** PancTu-I Zellen wurden in Gegenwart des Ca-Ionophors Ionomycin (500 ng/ml) und des Phorbolesters PMA (10, 50 oder 100 ng/ml) kultiviert. Nach einer, drei und 24 Stunden wurde Galektin-3 im Zellkulturüberstand mit ELISA überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten.

nen, wurde Phalloidin als Marker für filamentöses (F)-Aktin verwendet. Zusätzlich wurde noch Galektin-3 markiert um überprüfen zu können, ob Galektin-3 bei Ausbildung der Synapse aus den PDAC Zellen freigesetzt wird. Unabhängig vom Zeitpunkt nach Zugabe der  $\gamma\delta$  T Zellen lagen unter 1 % der Tumor- und T Zellen in Konjugaten vor (Daten nicht gezeigt). Dies könnte möglicherweise auf einen *kiss and run*-Mechanismus hindeuten, bei dem es nur einen kurzen Kontakt zwischen Tumor- und T Zelle gibt. Wurden allerdings sowohl die einzeln vorkommenden als auch die in Konjugaten vorliegenden PancTu-I Zellen analysiert, konnte eine von der Dauer der Kokultur abhängige unterschiedliche Lokalisation von Galektin-3 beobachtet werden. Hierzu wurde die im Materialien und Methodenteil beschriebene (Abschnitt 2.13.7) Peripheriemaske verwendet. Innerhalb dieses Rings, der die Zellperipherie und Zelloberfläche umfasst, wurde die Intensität der Galektin-3 Markierung bestimmt. In Abbildung 3.29 A und B sind zwei beispielhafte PancTu-I Zellen mit Galektin-3 Expression im Zentrum der Zelle (A) sowie in der Peripherie (B) dargestellt. Die Intensität der Galektin-3 Expression innerhalb der Peripheriemaske von PancTu-I Zellen (TUZ) allein (n=1) und von PancTu-I Zellen nach den angegebenen Zeiten der Kokultur mit  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen (Mittelwert von n=3 Spendern) ist in Abbildung 3.29 C dargestellt. Innerhalb der ersten fünf Minuten nach Zugabe der  $\gamma\delta$  T Zellen nahm die Galektin-3 Expression in der Zellperipherie leicht ab, was auf eine Freisetzung von Galektin-3 hindeuten könnte. Zehn, 20 und 45 Minuten nach Zugabe der  $\gamma\delta$  T Zellen stieg die Intensität der Galektin-3 Expression in der Peripherie allerdings deutlich an und lag 45 Minuten nach Zugabe der  $\gamma\delta$  T Zellen über 30 % über der Expression in Tumorzellen allein.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.29: Kokultur mit  $\gamma\delta$  T Zellen führt zur Zunahme der Galektin-3 Färbung in der Peripherie von PancTu-I Zellen.** PancTu-I Zellen wurden allein oder für die angegebene Zeit mit kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Phalloidin sowie mit  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ EpCAM und  $\alpha$ Galektin-3 mAk markiert und am Imagestream<sup>X</sup> MKII gemessen. Dargestellt ist das Fluoreszenzbild von Galektin-3, die Überlagerung des Fluoreszenzbildes von Galektin-3 mit dem Durchlichtbild und die Peripheriemaske für das Fluoreszenzbild von Galektin-3 an beispielhaften PancTu-I Zellen mit Galektin-3 Expression im Zentrum (A) oder in der Peripherie (B) der Zelle. Der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Intensität der Galektin-3 Expression in der Peripherie von PancTu-I Zellen nach Zugabe von  $\gamma\delta$  T Zellen von drei unterschiedlichen Spendern in einem Experiment ist in C dargestellt.

### *3.11 Primäre Ovarialkarzinom Zellen inhibieren partiell die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen*

Dies könnte auf eine mögliche Relokalisation von Galektin-3 aus dem Zellzentrum in Richtung Peripherie oder Zelloberfläche hindeuten.

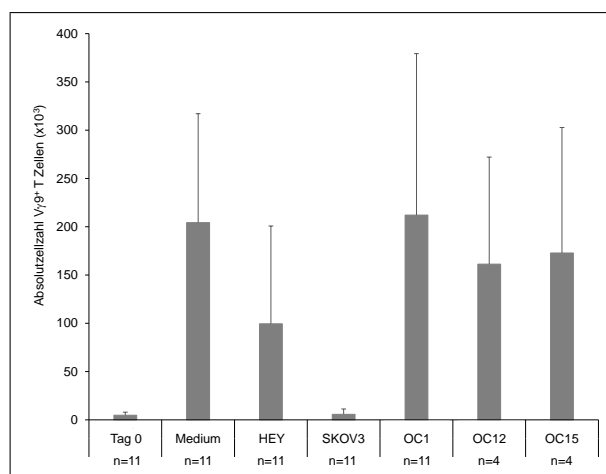
Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass PDAC Zellen in Kokultur mit kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen nach Zellkontakt Galektin-3 in Vesikeln zur Zelloberfläche bringen und dieses freisetzen, welches dann zu einer Inhibition der T Zellproliferation beiträgt.

## **3.11 Primäre Ovarialkarzinom Zellen inhibieren partiell die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen**

Wie in Abschnitt 3.8 dargestellt, ist bei PancTu-I Zellen Galektin-3 partiell verantwortlich für die Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen durch diese Tumorzellen. Zur Überprüfung, ob auch Zellen anderer Tumorentitäten die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen inhibieren, wurde die Proliferation in Gegenwart von sowohl etablierten Ovarialkarzinom Zelllinien als auch in primären Ovarialkarzinom Zellen (selbst etabliert) analysiert. Die etablierten Linien HEY und SKOV3 wurden uns freundlicherweise von Prof. Dirk Bauerschlag aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH zur Verfügung gestellt. Zusätzlich erhielten wir von Prof. Bauerschlag Tumore von Ovarialkarzinom-Patientinnen, aus welchen die primären Ovarialkarzinom Zellen OC1, OC12 und OC15 generiert wurden. Jeweils 5000 Zellen der Ovarialkarzinome wurden für 24 Stunden kultiviert, bevor 125.000 PBMZ hinzugefügt und mit Zoledronat plus IL-2 stimuliert wurden. Nach sechs-sieben Tagen wurde die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Absolutzellzahl mit SCDA bestimmt. Wie in Abbildung 3.30 dargestellt ist, konnten in diesen Experimenten in Abwesenheit von Tumorzellen nach sechs-sieben Tagen 200.000 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen gemessen werden. In Gegenwart von HEY Zellen waren nur noch 100.000, in Gegenwart von SKOV3 Zellen sogar nur noch 6000 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen zu detektieren. Die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen wurde in Gegenwart von OC1 Zellen nicht beeinflusst (212.000). In Gegenwart von OC12 Zellen oder OC15 Zellen konnte eine leichte Reduktion der Absolutzellzahl beobachtet werden (161.000 bzw. 173.000 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen).

Interessanterweise zeigten sich hier Unterschiede zwischen den ATCC-Linien und den aus frischen Tumoren. In Gegenwart der ATCC-Linien HEY und SKOV3 proliferierten  $\gamma\delta$  T Zellen schlechter, wohingegen die Proliferation in Gegenwart der aus frischen Tumoren etablierten Linien OC1, OC12 oder OC15 kaum beeinflusst war. Auch aus Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen wurden Tumorklinien etabliert, welche die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen ebenfalls deutlich verringerten (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie bei PDAC Zellen zeigte sich also

### 3 Ergebnisse



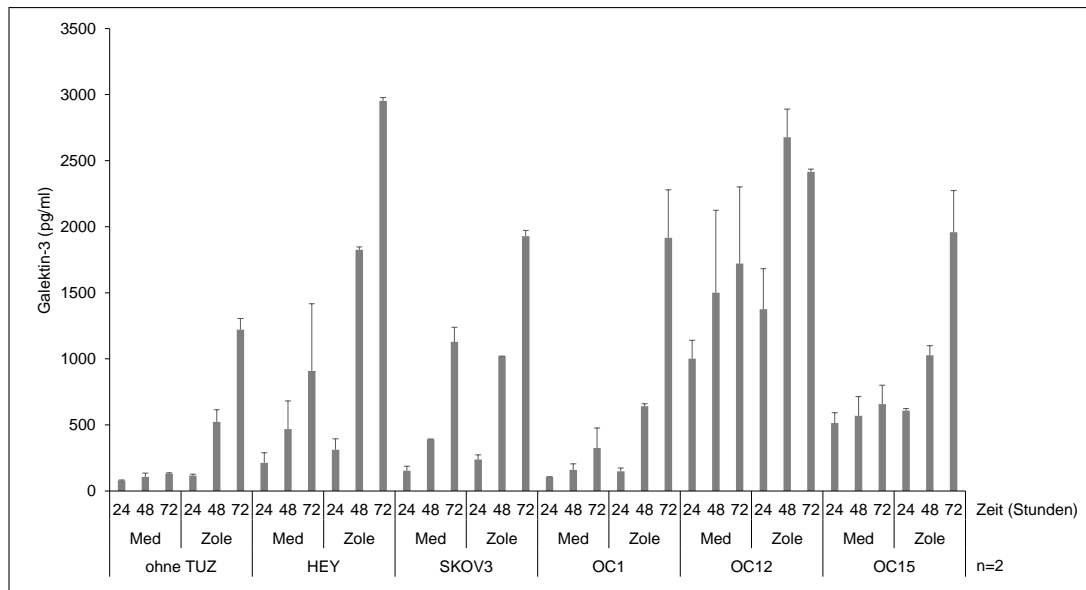
**Abbildung 3.30: Einige Ovarialkarzinom Zellen inhibieren die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ.** 5000 HEY, SKOV3, OC1, OC12 oder OC15 Zellen wurden in 96er Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden 125.000 PBMZ hinzugefügt und mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat in Gegenwart von 50 IU IL-2 stimuliert. Am Tag der Stimulation (Tag 0) und nach sechs bis sieben Tagen wurde die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Absolutzellzahl mit SCDA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten von vier oder elf Spendern.

auch in Kokultur mit Ovarialkarzinom Zellen, dass  $\gamma\delta$  T Zellen in Gegenwart einiger Linien gar nicht bzw. deutlich schlechter proliferierten. Sowohl HEY-, als auch SKOV3 Zellen zeigten eine deutliche Expression von Galektin-3. OC1-, OC12- und OC15 Zellen wiesen sogar eine noch höhere Galektin-3 Expression auf (Daten nicht gezeigt). Dieses wurde sowohl in Kokultur mit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen als auch in Kokultur mit PBMZ, die mit Zoledronat und IL-2 stimuliert wurden, freigesetzt (Abbildung 3.31, Daten nicht gezeigt). Schon in Abwesenheit von Ovarialkarzinom Zellen setzten mit Zoledronat stimulierte PBMZ nach 72 Stunden 1200 pg/ml Galektin-3 frei, welches u.a. aus den Monozyten stammen könnte. Wurden die PBMZ dagegen in Kokultur mit Ovarialkarzinom Zellen mit Zoledronat stimuliert, ließen sich deutlich größere Mengen Galektin-3 im Überstand nachweisen. Ca. 2000 pg/ml Galektin-3 waren nach 72 Stunden im Überstand der Kokultur von SKOV3-, OC1- und OC15 Zellen mit PBMZ nachweisbar. In Kokultur von HEY- und OC12 Zellen mit PBMZ akkumulierte die Galektin-3 Menge im Überstand dagegen auf ca. 2400 pg/ml (OC12 Zellen) oder 2950 pg/ml (HEY Zellen). Wurden die PBMZ in Kokultur mit Ovarialkarzinom Zellen nicht mit Zoledronat stimuliert, ließ sich ebenfalls Galektin-3 im Überstand nachweisen. Die nachgewiesene Menge war in Kokultur mit OC12 Zellen besonders hoch (1720 pg/ml). Ob das freigesetzte Galektin-3 aus Zellen der PBMZ oder aus Ovarialkarzinom Zellen stammte, wurde hingegen nicht analysiert.

Wie PDAC Zellen exprimierten Ovarialkarzinom Zellen Galektin-3 und eine Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von Ovarialkarzinom Zellen mit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen und auch in Kokultur mit PBMZ konnte nachgewiesen werden. Außerdem inhibierten die etablierten Ova-



### 3.12 Verteilung von $\gamma\delta$ T Zellen im Blut, Aszites und Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen



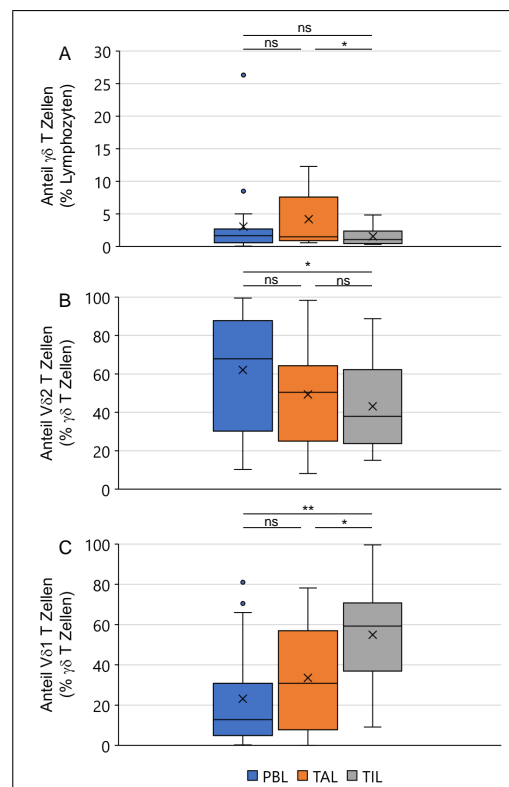
**Abbildung 3.31: Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von Ovarialkarzinomzellen mit PBMZ.** 5000 HEY, SKOV3, OC1, OC12 oder OC15 Zellen wurden in 96er Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden 125.000 PBMZ hinzugefügt und mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat in Gegenwart von 50 IU IL-2 stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Galektin-3 Menge im Überstand mit ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten von zwei Spendern.

rialkarzinom Zelllinien HEY und SKOV3 die Proliferation der  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ.

### 3.12 Verteilung von $\gamma\delta$ T Zellen im Blut, Aszites und Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen

In den dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass von Tumorzellen freigesetztes Galektin-3 *in vitro* zu einer Proliferationsinhibition von  $V\gamma 9V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen führt. Um zu überprüfen, ob Hinweise auf eine Proliferationsinhibition auch *in vivo* zu beobachten sind, wurden periphere Blut Lymphozyten (PBL), Tumor Aszites Lymphozyten (TAL) und Tumorf infiltrierende Lymphozyten (TIL) aus Blut, Aszites und Tumorgewebe von 21 (Blut) bzw. 14 (Aszites, Tumor) Ovarialkarzinom Patientinnen isoliert. Der Anteil an  $\gamma\delta$  T Zellen,  $V\delta 1$ - und  $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch in den isolierten Zellpopulationen untersucht (Abbildung 3.32). Der Median des Anteils an  $\gamma\delta$  T Zellen (A) war mit 1,1 % (Mittelwert 1,6 %) in den TIL im Vergleich zu 1,7 % (Mittelwert 3,2 %) in den PBL und 1,5 % (Mittelwert 4,2 %) in den TAL leicht reduziert. In PBL und TAL war der Anteil der  $\gamma\delta$  T Zel-

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.32: Unterschiedliche Verteilung von V $\delta$ 1- und V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen in Blut, Aszites und Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen.** Periphere Blut Lymphozyten (PBL, blau), Tumor Aszites Lymphozyten (TAL, orange) und Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL, grau) von Ovarialkarzinom Patientinnen wurden isoliert und die Anteile von  $\gamma\delta$  T Zellen (A) mit V $\delta$ 2- (B) oder V $\delta$ 1 (C)-Elementen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten von 21 (Blut) oder 14 (Aszites, Tumor) Patientinnen sind als Boxplots dargestellt, wobei der Median mit einem Strich und der Mittelwert mit einem X gekennzeichnet ist. Ausreißer, definiert als Punkte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands liegen, wurden separat eingezeichnet. Die Daten wurden mit einem zweiseitigen Mann-Whitney U Test auf statistische Signifikanz überprüft: \*\*: p<0,01; \*:p<0,05; ns: nicht signifikant.

len ungefähr gleich, wobei die Streuung der Werte in den TAL deutlich höher war. Der Anteil der V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen war hingegen in den TAL (Median 50 %, Mittelwert 49 %) im Vergleich zu den PBL (Median 68 %, Mittelwert 62 %) reduziert. Noch kleiner (leicht signifikant im Vergleich zum Anteil in PBL) war der Anteil der V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen in den TIL (Median 38 %, Mittelwert 43 %). Im Gegensatz dazu war der Anteil der V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen in den TAL (Median 31 %, Mittelwert 34 %) im Vergleich zu den PBL (Median 13 %, Mittelwert 23 %) erhöht. Signifikant erhöht war der Anteil der V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen in den TIL (Median 59 %, Mittelwert 55 %). Es zeigten sich also nur kleine Unterschiede im Anteil der  $\gamma\delta$  T Zellen in den unterschiedlichen Zellpopulationen. Allerdings war die Verteilung der Subpopulationen der  $\gamma\delta$  T Zellen deutlich unterschiedlich. Der Anteil der V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen war in den TAL und TIL im Vergleich zu den PBL deutlich reduziert, wohingegen der Anteil der V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen in den

### 3.12 Verteilung von $\gamma\delta$ T Zellen im Blut, Aszites und Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen

TIL und TAL im Vergleich zu den PBL deutlich erhöht war. Dies könnte darauf hindeuten, dass die *in vitro* beobachtete Proliferationsinhibition von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen nach Stimulation mit Zoledronat oder BrHPP durch PDAC- oder Ovarialkarzinom Zellen auch *in vivo* von Bedeutung sein könnte.



# 4 Diskussion

## 4.1 Expression von Galektin-3 in PDAC Zellen und Ovarialkarzinom Zellen

Galektin-3 wird vielfach als mögliches immunsuppressives Molekül diskutiert. Ob es allerdings auch in der Interaktion von primären humanen T Zellen, insbesondere  $\gamma\delta$  T Zellen, mit PDAC Zellen oder Ovarialkarzinom Zellen eine Rolle spielt, war bislang ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte beschrieben werden, dass Galektin-3 von PDAC Zellen und auch von Ovarialkarzinom Zellen exprimiert wird. In PDAC Zellen konnte eine Lokalisation in Vesikeln festgestellt werden. Zur näheren Charakterisierung dieser Vesikel wurde die Kolokalisation von Galektin-3 mit den vesikulären Markerproteinen CD107a, CD63, Rab11 und Vti1b untersucht. Es ergaben sich Hinweise, dass Galektin-3 in PDAC Zellen nicht bzw. nur in geringem Maße mit CD107a kolokalisiert, obwohl es z.B. in Makrophagen als Bindungspartner von CD107a beschrieben wurde (Dong and Hughes, 1997). Eine unterschiedliche Bindung und eine damit eventuell einhergehende Kolokalisation von Galektin-3 an CD107a könnte durch ein anderes Glykosylierungsmuster von CD107a begründet sein. In zwei chronischen myeloischen Leukämie (CML) Zelllinien sind z.B. LAMP1 und auch LAMP2 unterschiedlich glykosyliert (Carlsson and Fukuda, 1990). Ergänzend konnten Bax et al. (2007) zeigen, dass ein bei der Reifung von unreifen (immature) Dendritischen Zellen (iDC) zu reifen (mature) DC (mDC) verändertes Zuckerprofil mit einer veränderten Bindung von Galektin-3 einhergeht. Es konnte ebenfalls keine Kolokalisation von Galektin-3 mit den anderen untersuchten vesikulären Markerproteinen CD63, Rab11 und Vti1b festgestellt werden. In anderen Studien konnte Galektin-3 sowohl in Exosomen von DCs als auch in Exosomen von Blasenkarzinomzellen nachgewiesen werden, was die Vermutung nahe legt, dass die Galektin-3 positiven Vesikel in PancTu-I Zellen ebenfalls Exosomen sein könnten (Théry et al., 2001; Welton et al., 2010). Im RTCA Assay erhöhte zu PDAC Zellen exogen zugegebenes Galektin-3 den Zellindex, welcher ein Indikator für Zellproliferation oder *cell spreading* ist. Hierbei waren die Effekte bei PDAC Zellen mit geringer Galektin-3 Expression deutlich größer als bei Zellen mit hoher Galektin-3 Expression. Auch die Migration von PDAC Zellen wurde durch Galektin-3 beeinflusst. Nach Herunterregulation von Galektin-3 mit siRNA konnten PancTu-I Zellen in einem Wundheilungsassay die induzierte „Wunde“ anders als mit kontroll siRNA transfizierte

#### 4 Diskussion

PancTu-I Zellen nicht schließen. Auch Kobayashi und Kollegen konnten zeigen, dass Galektin-3 in Panc1 Zellen *in vitro* die Migration und Invasion reguliert (Kobayashi et al., 2011b). Es fanden sich Hinweise, dass dies über einen Mechanismus geschah, in den Akt, GSK-3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin involviert waren, welche eine wichtige Rolle bei der Invasion von PDAC Zellen spielen (Kobayashi et al., 2011b). Eine Veränderung der Proliferation von Panc1 Zellen in Abhängigkeit von Galektin-3 konnte in dieser Studie allerdings nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten Jiang und Kollegen in SW1990 PDAC Zellen eine proliferationsfördernde Funktion von rekombinantem Galektin-3 zeigen (Jiang et al., 2008). Die Inkubation mit mAk gegen Galektin-3 führte außerdem zu einer Proliferationsinhibition. Song und Kollegen konnten für Panc1- und MPanc96 Zellen ebenfalls eine proliferationsfördernde Funktion von Galektin-3 zeigen. Zusätzlich entwickelten Mäuse nach orthotoper Transplantation von PDAC Zellen mit Galektin-3 Knockdown deutlich kleinere Tumore als nach Transplantation von PDAC Zellen mit normaler Galektin-3 Expression (Song et al., 2012).

Sowohl etablierte Ovarialkarzinom Zelllinien wie HEY und SKOV3 als auch die selbst generierten primären Ovarialkarzinom Zellen exprimierten Galektin-3 deutlich (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation von Galektin-3 in Tumoren von Ovarialkarzinom Patientinnen bisher nicht untersucht. Dies wäre von großem Interesse auch für die Prognose der Patientinnen, da in Untersuchungen mit 150 Ovarialkarzinom Patientinnen nukleär exprimiertes Galektin-3 als ein möglicher positiver prognostischer Marker für das Ovarialkarzinom vorgeschlagen wurde (Schulz et al., 2017). Hossein und Kollegen konnten zeigen, dass Galektin-3 die Zellproliferation von SKOV-3 Zellen sowie deren Adhäsion an Kollagen erhöht. Außerdem besitzt Galektin-3 in SKOV3 Zellen einen anti-apoptotischen Effekt. Die Inhibition von Galektin-3 in SKOV3 Zellen mit modifiziertem Citruspektin (MCP) erhöhte die Sensitivität gegenüber Chemotherapie mit Paclitaxel (Hossein et al., 2013). Auch Lu und Kollegen konnten zeigen, dass eine Herunterregulation von Galektin-3 in SKOV3 Zellen zu einer verringerten Migration führte. Hierbei war die mRNA Menge von Galektin-3 stark herunterreguliert, allerdings war trotz Herunterregulation noch eine recht starke Galektin-3 Proteinexpression zu detektieren (Lu et al., 2016). In unserer Gruppe konnte Galektin-3 in primären OC1 und OC15 Zellen auf Proteinebene mit siRNA sehr effizient herunterreguliert werden. Dies führte in einem Wundheilungsassay dazu, dass die induzierte „Wunde“ nicht mehr geschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wir konnten also zeigen, dass Galektin-3 nicht nur in etablierten Linien, sondern vor allem auch in primären Ovarialkarzinom Zellen einen Einfluss auf die Migration besitzt.

Ob in den untersuchten PDAC Zellen und Ovarialkarzinomzellen *single nucleotide polymorphism* (SNP) im Galektin-3 Gen vorliegen, wurde nicht analysiert. Diese könnten mit verän-

## 4.2 Freisetzung von Galektinen durch PDAC Zellen

dernten Funktionen von Galektin-3 einhergehen. In Brustkrebspatientinnen wurde ein SNP an Position 191 des Galektin-3 Gens beschrieben, der die Aminosäure Prolin an Position 64 durch Histidin ersetzt. Frauen, die diesen SNP aufweisen haben ein höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Zusätzlich scheint es Unterschiede in der Expression des SNP in verschiedenen Ethnien zu geben (Balan et al., 2008). Ein weiterer SNP im Galektin-3 Gen ist mit der Prognose von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) sowie mit deren Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert (Wu et al., 2012).

## 4.2 Freisetzung von Galektinen durch PDAC Zellen

Da Galektin-3 von PDAC Zellen exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob Galektin-3 auch durch PDAC Zellen freigesetzt wird. Hierzu wurden zunächst PDAC Zellen für 24 bis 72 Stunden kultiviert und die Galektin-3 Menge im Zellkulturüberstand mit ELISA bestimmt. Im Überstand von PDAC Zellen mit geringer Galektin-3 Expression (Panc1-, Panc89 Zellen) konnte kein Galektin-3 detektiert werden. Von einigen PDAC Zellen mit starker Galektin-3 Expression (Colo357-, Capan-1 Zellen) wurden jedoch geringe Mengen Galektin-3 in den Überstand freigesetzt. PancTu-I Zellen, die ebenfalls eine starke Galektin-3 Expression zeigten, setzten jedoch kaum Galektin-3 frei. Als Kontrolle diente Galektin-9, welches von keiner der analysierten PDAC Zellen freigesetzt wurde. In Kokultur mit T Zellen wurden jedoch große Mengen Galektin-3 und auch etwas geringere Mengen Galektin-9 in den Überstand freigesetzt. Die Menge der Galektin-3 Freisetzung war hierbei abhängig von der Galektin-3 Expression in den PDAC Zellen. In Kokultur mit Zellen mit geringer Galektin-3 Expression (Panc1-, Panc89 Zellen) wurde deutlich weniger Galektin-3 freigesetzt als in Kokultur mit Zellen mit starker Galektin-3 Expression. Schon diese initialen Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Galektin-3 in Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen durch die PDAC Zellen freigesetzt wurde. Allerdings setzten auch T Zellen alleine geringe Mengen Galektin-3 frei, weshalb nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Galektin-3 in Kokultur auch von T Zellen freigesetzt wurde. Zur Analyse dieser Frage wurde Galektin-3 in PancTu-I Zellen mit siRNA herunterreguliert und anschließend eine Kokultur mit T Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach Herunterregulation von Galektin-3 in den PDAC Zellen deutlich weniger Galektin-3 im Überstand zu detektieren war als im Überstand der Kokultur mit kontroll siRNA transfizierten PancTu-I Zellen und T Zellen. Das in der Kokultur freigesetzte Galektin-3 wurde also von den PDAC Zellen freigesetzt.

Während in dieser Arbeit die Freisetzung von Galektin-3 durch Tumorzellen gezeigt werden

#### 4 Diskussion

konnte, stellten Kouo und Kollegen in einem Mausmodell für PDAC interessanterweise fest, dass Galektin-3 in der Tumormikroumgebung des PDAC von T Zellen und anderen Zellen freigesetzt wird, aber nicht durch Tumorzellen (Kouo et al., 2015). Im Gegensatz dazu konnten Iurisci und Kollegen zeigen, dass im Menschen nach Entfernung des Tumors von Kolorektalkarzinompatienten die Konzentration von Galektin-3 im Serum deutlich abfiel (Iurisci et al., 2000). Auch bei PDAC Patienten konnte nach der Entfernung des Tumors eine Verringerung der Galektin-3 Konzentration im Serum beobachtet werden (Gaida et al., 2012). Allerdings konnte in beiden Studien nicht unterschieden werden, ob Galektin-3 durch die Tumorzellen oder andere Tumor-assoziierte Zellen freigesetzt wurde.

Interessanterweise zeigten sich Unterschiede in der Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur in Abhängigkeit der verwendeten T Zellpopulationen. In Kokultur von PancTu-I Zellen sowohl mit CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen als auch mit CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen war eine Stimulation der T Zellen mit Aktivierungs-/Expansions-Beads oder bsAk [HER2xCD3] notwendig, um eine Galektin-3 Freisetzung im Überstand zu detektieren. In Kokultur mit  $\gamma\delta$  T Zellen war die freigesetzte Menge Galektin-3 unabhängig vom Stimulus. Dies lässt sich möglicherweise mit der Isolation der T Zellen erklären. Während CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen mit einem CD4- bzw. CD8 Microbead Kit isoliert wurden, wurden  $\gamma\delta$  T Zellen mit einem TZR  $\gamma\delta$  Isolation Kit isoliert. Hierbei wurden CD4 oder CD8 über Microbeads gebunden und alle gebundenen Zellen isoliert.  $\gamma\delta$  T Zellen wurden über den TZR gebunden. Hierbei könnte im Vergleich zur Isolation über die Korezeptoren bereits eine stärkere Voraktivierung der  $\gamma\delta$  T Zellen stattgefunden haben, was dazu führen könnte, dass diese in Kokultur mit PDAC Zellen möglicherweise bereits aktiviert sind und somit kein zusätzlicher Stimulus mehr notwendig ist. Interessanterweise war in Kokultur von PancTu-I Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien sowohl bei  $\alpha\beta$  T Zellen als auch bei  $\gamma\delta$  T Zellen ein Stimulus notwendig, damit hohe Galektin-3 Mengen freigesetzt wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hohe Freisetzung in Kokultur von PancTu-I Zellen mit frisch isolierten  $\gamma\delta$  T Zellen auf die Voraktivierung der  $\gamma\delta$  T Zellen zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, könnten in weiteren Experimenten  $\gamma\delta$  T Zellen über negative Isolation isoliert werden. Hierbei werden alle Zellen außer den  $\gamma\delta$  T Zellen mit mAk markiert und depletiert, wodurch die verbleibende Fraktion *untouched*  $\gamma\delta$  T Zellen enthält. Da das Kit von Miltenyi allerdings Antikörper gegen CD16 enthält (zur Depletion von NK Zellen), würde man auf diese Weise auch CD16-positive  $\gamma\delta$  T Zellen depletieren und somit keine einheitliche  $\gamma\delta$  T Zellpopulation untersuchen.

Galektin-9 wurde von PDAC Zellen alleine nicht freigesetzt. Unter den frisch isolierten T Zellpopulationen setzten lediglich CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen Galektin-9 nach Stimulation mit Aktivierungs-/Expansions-Partikeln (Beads) oder bsAk frei. Dabei war die nach Stimulation mit Beads frei-



### 4.3 Mechanismen der Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen

gesetzte Menge deutlich höher als nach Stimulation mit bsAk. Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> kurzzeit aktivierte  $\alpha\beta$  T Zelllinien setzten nach Stimulation mit Beads Galektin-9 frei. Da die Beads mit mAk gegen CD2, CD3 und CD28 markiert sind, deutet dies darauf hin, dass eine Kostimulation von  $\alpha\beta$  T Zellen über CD28 für eine Freisetzung größerer Mengen Galektin-9 notwendig ist. Kurzzeit aktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zelllinien setzten nach Stimulation mit BrHPP größere Mengen Galektin-9 frei. Da nach Stimulation mit bsAk nur sehr geringe Mengen Galektin-9 freigesetzt wurden, scheint die Freisetzung abhängig von der Aktivierung der T Zellen zu sein. Allerdings wurde von unserer Gruppe beschrieben, dass BrHPP im Gegensatz zum bsAk [(HER2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] Zelltod in kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen induziert (Oberg et al., 2015). Es könnte also sein, dass das freigesetzte Galektin-9 aus absterbenden  $\gamma\delta$  T Zellen stammt. Auch in Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit PDAC Zellen wurden Galektin-9 Mengen in ähnlicher Höhe wie von den kurzzeit aktivierten T Zelllinien alleine freigesetzt. Dies deutet darauf hin, dass in dieser Kokultur im Gegensatz zur Freisetzung von Galektin-3 kein Galektin-9 von den PDAC Zellen freigesetzt wurde. Im Gegensatz dazu wurde in Kokultur von Panc89-, PancTu-I- und Capan-1 Zellen mit frisch isolierten T Zellen Galektin-9 im Überstand detektiert. Ob Galektin-9 allerdings von den PDAC Zellen oder von den frisch isolierten T Zellen freigesetzt wurde, ist unklar. Hier könnte ähnlich wie für Galektin-3 die Herunterregulation von Galektin-9 in den PDAC Zellen mit siRNA aufklären, ob diese für die Galektin-9 Freisetzung verantwortlich sind.

### 4.3 Mechanismen der Freisetzung von Galektin-3 durch PDAC Zellen

In Abschnitt 3.3.4 konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Galektin-3 durch PancTu-I Zellen in Kokultur sowohl mit  $\alpha\beta$  als auch mit  $\gamma\delta$  T Zellen von direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen Tumor- und T Zellen abhängig ist. Da die Freisetzung von Galektin-3 nach Stimulation der T Zellen mit BrHPP/Beads oder bsAk deutlich stärker war, liegt die Vermutung nahe, dass die Freisetzung von Galektin-3 mit der Lyse der PDAC Zellen korreliert. Allerdings sind nur geringe Unterschiede in der Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von  $\gamma\delta$  T Zellen mit PancTu-I Zellen zwischen der Stimulation der  $\gamma\delta$  T Zellen mit BrHPP oder bsAk zu beobachten. Die zytotoxische Aktivität von  $\gamma\delta$  T Zellen gegenüber PancTu-I Zellen ist jedoch nach Stimulation mit bsAk deutlich größer als nach Stimulation mit BrHPP (Oberg et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass die Lyse der PancTu-I Zellen durch  $\gamma\delta$  T Zellen eher eine unter-

#### 4 Diskussion

geordnete Rolle für die Freisetzung von Galektin-3 spielt.

Um zu analysieren welche Signalwege bei der Freisetzung von Galektin-3 durch PancTu-I Zellen eine Rolle spielen, wurde überprüft, ob durch den Phorbolster PMA und den Calcium-Ionophor Ionomycin Galektin-3 Freisetzung induziert werden kann. Bei der Differenzierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen durch die Verwendung des Phorbolsters PMA war die Galektin-3 Expression bereits nach sechs Stunden deutlich erhöht (Kim et al., 2003). Joo und Kollegen konnten zeigen, dass aktivierte murine T Lymphozyten geringe Mengen Galektin-3 spontan freisetzen. Dies konnte durch Stimulation mit einem Calcium-Ionophor deutlich verstärkt werden (Joo et al., 2001). Auch Liu und Kollegen konnten Galektin-3 Expression und Freisetzung durch humane Monozyten nach Stimulation mit einem Calcium-Ionophor beobachten (Liu et al., 1995). In PancTu-I Zellen führte die Stimulation mit dem Phorbolster PMA und dem Calcium-Ionophor Ionomycin allerdings zu keiner deutlichen Induktion der Galektin-3 Freisetzung (Abschnitt 3.10). Für die Freisetzung von Galektin-3 durch PancTu-I Zellen scheint hingegen insbesondere Zell-Zell-Kontakt notwendig zu sein. Für die akute lymphatische Leukämie (ALL) konnte gezeigt werden, dass Galektin-3, das von Stromazellen exprimiert und freigesetzt wird, selbst die Galektin-3 Produktion in ALL Zellen induziert (Fei et al., 2015). Das endogen produzierte Galektin-3 wiederum schützte dann die ALL Zellen vor Chemotherapeutika (Fei et al., 2013). Die Freisetzung von Galektin-3 wird in verschiedenen Zellen also unterschiedlich ausgelöst.

In Untersuchungen der Interaktion von PancTu-I Zellen mit  $\gamma\delta$  T Zellen im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Intensität der Galektin-3 Markierung in der Zellperipherie der PancTu-I Zellen ein bis drei Minuten nach Beginn der Kokultur kurz abnahm, nach 45 Minuten jedoch deutlich zugenommen hatte (Abschnitt 3.10). Oberflächennahes Galektin-3 könnte also nach Zugabe von T Zellen zunächst innerhalb sehr kurzer Zeit freigesetzt werden, woraufhin dann weiteres Galektin-3 in Richtung Zellperipherie oder Zelloberfläche transportiert wird. Da Galektin-3 keine Signalsequenz besitzt, scheint eine Freisetzung über den Weg des Endoplasmatischen Retikulums/Trans-Golgi-Netzwerkes eher unwahrscheinlich. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren des klassischen sekretorischen Weges Brefeldin A und Monensin die Freisetzung von Galektin-3 durch *baby hamster kidney* (BHK) Zellen oder *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen nicht inhibieren (Lindstedt et al., 1993; Sato et al., 1993a). Die Freisetzung in Exosomen könnte eine Möglichkeit der Galektin-3 Freisetzung sein. In Exosomen von Tumorzellen (Blasenkarzinom Zellen) wurde Galektin-3 bereits identifiziert (Welton et al., 2010). Exosomen sind in immunologischen Synapsen zwischen T Zellen und antigenpräsentierenden B Zellen eine wichtige Komponente der Synapse (Choudhuri et al., 2014). Außerdem konnte in Jurkat Zellen gezeigt werden, dass Galektin-3 in der im-

#### 4.4 Galektine inhibieren die Proliferation von T Zellen

munologischen Synapse mit Alix assoziiert, einem Protein, das bei der Bildung von Exosomen eine wichtige Rolle einnimmt (Baietti et al., 2012; Chen et al., 2009). Auch andere Galektine wurden neben Galektin-3 in Exosomen von Tumorzellen beobachtet. So setzen EBV-infizierte Nasopharynxkarzinom Zellen Exosomen frei, die Galektin-9 enthalten (Keryer-Bibens et al., 2006). Auch Galektin-1 wurde in Exosomen von Plattenepithelkarzinom Zellen des Kopf- und Halsbereiches gefunden. Diese Exosomen konnten einen suppressiven Phänotyp in CD8<sup>+</sup> T Zellen induzieren (Maybruck et al., 2017).

Die Freisetzung von Galektin-3 könnte auch durch Proteolyse geschehen. Die Matrix Metalloproteinasen (MMP)-2 und -9, die Galektin-3 spalten können, könnten an Rezeptoren oder extrazelluläre Matrix gebundenes Galektin-3 freisetzen (Ochieng et al., 1994). MMP-2 und -9 spalten Galektin-3 zwischen Aminosäure Alanin<sup>62</sup> und Tyrosin<sup>63</sup>. Das dabei entstehende 22 kDa Fragment unterscheidet sich in seinen biologischen Funktionen deutlich von ungespaltenem Galektin-3. Das 22 kDa Fragment bindet z.B. mit 20fach höherer Affinität an Epithelzellen und an Laminin (Ochieng et al., 1998a; Shekhar et al., 2004). Sowohl MMP-2 als auch MMP-9 sind in 50% der Tumorzellen und im Stroma des PDAC exprimiert (Giannopoulos et al., 2008; Jakubowska et al., 2016). Die Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von PDAC Zellen mit T Zellen könnte also auch über MMP-2 oder -9 vermittelt sein.

#### 4.4 Galektine inhibieren die Proliferation von T Zellen

In Abschnitt 3.6 konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Galektin-3 die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ inhibiert. Dies könnte zum einen durch die Induktion von Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen geschehen. Fukumori und Kollegen konnten zeigen, dass hohe Konzentrationen (15  $\mu$ M) rekombinantes Galektin-3 Apoptose in den T Zelllinien MOLT-4 und Jurkat sowie in PBMZ auslöst, wobei ungeklärt bleibt, in welchen Zellen innerhalb der PBMZ Apoptose induziert wurde. Hierbei wurde der Zelltod über Bindung von Galektin-3 an CD7 und CD29 vermittelt, was in der Freisetzung von Cytochrom C sowie einer Caspase-3-Aktivierung resultierte und für einen mitochondrialen Apoptoseweg spricht (Fukumori et al., 2003). In Gegenwart von Laktose konnte Galektin-3 jedoch keine Apoptose mehr induzieren, was darauf hindeutet, dass Galektin-3 Apoptose Karbohydrat-abhängig induziert (Fukumori et al., 2003). Xue et al. (2017) hingegen zeigten, dass 2,5  $\mu$ M Galektin-3 in Jurkat T Zellen Apoptose unabhängig von CD29 induziert. In dieser Studie konnte eine Induktion der Apoptose über *extracellular signal-related kinase* (ERK)-Phosphorylierung und folgende Caspase-9- und Caspase-3-Aktivierung durch Galektin-3 gezeigt werden, was eher auf einen extrinsischen Apoptose-

#### 4 Diskussion

weg hindeutet (Xue et al., 2017). Auch Peng und Kollegen konnten zeigen, dass 50  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantes Galektin-3, was einer Konzentration von ca. 2  $\mu\text{M}$  entspricht, Aktivierungsinduzierten Zelltod in Tumor-reaktiven T Zellen induziert (Peng et al., 2008). Die in diesen Studien verwendeten Galektin-3 Konzentrationen waren allesamt im mikromolaren Bereich. Im Serum von Patienten waren die gefundenen Galektin-3 Konzentrationen jedoch um mehrere log-Stufen niedriger: Im Serum von Patienten mit PDAC konnten 5 ng/ml Galektin-3 detektiert werden (Xie et al., 2012). In Serum von gesunden Blutspendern konnten Galektin-3 Konzentrationen zwischen 20 und 300 ng/ml nachgewiesen werden, wohingegen im Serum von Patienten mit Tumoren aus diversen Entitäten Galektin-3 Konzentrationen zwischen 20 und 950 ng/ml gemessen wurden (Iurisci et al., 2000). Aus diesem Grund verwendeten wir zur Analyse, ob Galektin-3 Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen induziert, Konzentrationen von 0,1 bis 1  $\mu\text{g/ml}$ . Im Gegensatz zu Galektin-9 löste Galektin-3 in diesen Konzentrationen keinen Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen aus (siehe Abschnitt 3.5). Die Daten von kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen dreier Spender, mit denen die Annexin-V/PI-Färbung durchgeführt wurde, konnte mit weiteren Spendern in Experimenten reproduziert werden, in denen tote Zellen nur mit PI markiert wurden (Daten nicht gezeigt). Ob auch frisch isolierte  $\gamma\delta$  T Zellen resistent gegenüber der Induktion von Zelltod von Galektin-3 sind, wurde nicht geklärt. Dies ist aber anzunehmen, da frisch isolierte T Zellen als ruhende T Zellen eingestuft werden, welche nach initialer Stimulation bis zu ihrer Restimulation meist resistent gegenüber der Induktion von Zelltod sind (Klas et al., 1993). Dies liegt u.a. an *cellular FLICE-inhibitory protein* (c-FLIP), welches in ruhenden T Zellen und während der Aktivierung von T Zellen exprimiert ist und die Induktion von Apoptose inhibiert. Sechs Tage nach Aktivierung ist weniger c-FLIP in T Zellen exprimiert und es kann Apoptose in T Zellen ausgelöst werden (Irmeler et al., 1997).

Im Gegensatz zu Galektin-3 induzierte Galektin-9 in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  massiv Zelltod in kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen. Dies konnte durch Zugabe von Laktose, verhindert werden, was darauf schließen lässt, dass die Galektin-9 vermittelte Apoptose Karbohydrat-abhängig ist (Daten nicht gezeigt). Auch die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ wurde durch Galektin-9 nahezu komplett inhibiert (Daten nicht gezeigt). Gieseke und Kollegen konnten zudem zeigen, dass die Proliferation von humanen  $\alpha\beta$  T Zellen innerhalb der PBMZ durch von mesenchymalen Stromazellen freigesetztes Galektin-9 ebenfalls verringert wurde (Gieseke et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Galektin-9 durch IFN- $\gamma$  sowohl in MSC als auch in Endothelzellen und Fibroblasten induziert wird (Asakura et al., 2002; Imaizumi et al., 2002). Nach Aktivierung von  $\gamma\delta$  T Zellen werden große Mengen IFN- $\gamma$  und auch TNF- $\alpha$  freigesetzt. Dies könnte die Freisetzung von Galektin-9 durch einige PDAC Zellen in Kokultur mit  $\gamma\delta$  T Zellen erklären. Da Galektin-9 Zelltod in  $\gamma\delta$  T

#### 4.4 Galektine inhibieren die Proliferation von T Zellen

Zellen induziert, liegt die Vermutung nahe, dass von PDAC Zellen in Kokultur mit T Zellen freigesetztes Galektin-9 zur Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen beiträgt. Ein möglicher Mechanismus der Induktion von Zelltod in T Zellen durch Galektin-9 wäre über die Bindung von Galektin-9 an *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing* (TIM)-3. Zhu et al. (2005) konnten zeigen, dass Galektin-9 an TIM-3 bindet und Kalzium Flux, Aggregation und Zelltod von murinen  $T_H1$ -Zellen *in vitro* induzierte. Die Bindung von Galektin-9 an TIM-3 ist Gegenstand gegenwärtiger Diskussionen. Leitner et al. (2013) konnten z.B. keine Bindung von Galektin-9 an TIM-3 nachweisen. Interessanterweise konnte in dieser Studie auch keine Proliferationsinhibition von T Zellen durch Galektin-9 induziert werden. Allerdings wurde Galektin-9 hier nicht rekombinant hinzugegeben, sondern auf der Oberfläche von T Zellen, die über Membran-gebundene CD3-Antikörperfragmente andere T Zellen stimulieren können, sogenannten „Stimulationszellen“ exprimiert (Leitner et al., 2010). Möglicherweise gibt es Unterschiede zwischen Membran-gebundenem Galektin-9 und löslichem Galektin-9 in der Induktion von Zelltod in T Zellen. (Bi et al., 2008) zeigten, dass die C-terminale CRD von Galektin-9 verantwortlich ist für die Induktion von Zelltod in Jurkat T Zellen. Auch hier war die Induktion von Zelltod unabhängig von TIM-3. Während TIM-3 für den Galektin-9-vermittelten Zelltod in murinen  $T_H1$  T Zellen notwendig ist, scheint Galektin-9 in humanen T Zellen Zelltod über andere Mechanismen zu induzieren.

Obwohl rekombinantes Galektin-3 in den verwendeten Konzentrationen keinen Zelltod in  $\gamma\delta$  T Zellen induzierte, inhibierte es trotzdem deren Proliferation. Auch PancTu-I Zellen, die in Kokultur mit kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen hohe Mengen Galektin-3 freisetzen, inhibierten die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ.

Zur Analyse des Effektes von Galektin-3 in der Interaktion von Tumorzellen und T Zellen wurde Galektin-3 in Tumorzellen über siRNA herunterreguliert. Die Vorinkubation von PBMZ mit Laktose und LacNAc konnte die Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen durch PancTu-I Zellen nur in geringem Maße beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass Disaccharide oder Monosaccharide sehr kleine Liganden für Galektine sind. Die Dissoziationskonstante, die für die Biotin-Avidin-Bindung  $10^{-15}$ M oder für die Immunoglobulin-Antigen-Bindung  $10^{-12}$ M beträgt, liegt für die Bindung von humanem Galektin-3 an Laktose oder N-Acetyl-Laktosamin nur im Millimolaren Bereich (Bachhawat-Sikder et al., 2001; Laitinen et al., 2006; Stubenrauch et al., 2013). Im biologischen Kontext binden Galektine keine löslichen Disaccharide sondern Zuckerstrukturen an Proteinen. In glykosylierten Proteinen weisen die Zuckerstrukturen z.B. mehrere Lactosamine auf, die dann von multimerisierten Galektinen erkannt werden. Die Bindungsaffinitäten der einzelnen CRDs können dann additiv

#### 4 Diskussion

oder synergistisch wirken, wodurch eine deutlich stärkere Bindung von Galektinen vermittelt wird (Dam and Brewer, 2010). Außerdem könnte die Spezifität oder Bindungsaffinität von Galektin-3 durch bestimmte Peptidsequenzen in der Umgebung des N-Acetyl-Laktosamin beeinflusst werden. Zusätzlich bindet LacNAc auch an viele andere Galektine, wodurch nicht der Effekt von Galektin-3 alleine beobachtet werden könnte. Insgesamt lassen die Daten darauf schließen, dass die Interaktion von Galektin-3 mit Kohlenhydraten für die Proliferationsinhibition eine untergeordnete Rolle spielt. Antikörper gegen Galektin-3 und auch Isotypkontroll-Antikörper beeinflussten die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ selbst, weshalb sie ungeeignet für die Analyse des Effektes von durch PDAC Zellen freigesetztes Galektin-3 in der Proliferationsinhibition sind (siehe Abbildung 6.5 im Anhang). Auch LacNAc selbst inhibiert die Proliferation von durch Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten T Zellen (Melief et al., 2017). Aus diesen Gründen ist die Herunterregulation von Galektin-3 mit siRNA in Tumorzellen die verlässlichere Methode um die spezifischen Effekte von Galektin-3 in der Interaktion von Tumorzellen und T Zellen zu untersuchen.

Durch Herunterregulation von Galektin-3 in PancTu-I Zellen konnte die Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ in Kokultur zum großen Teil aufgehoben werden. Auch in einem Protokoll für die Expansion von Tumor-spezifischen T Zellen unter GMP Bedingungen für den adoptiven Transfer in Melanompatienten konnten PBMZ in Kokulturen von PBMZ mit bestrahlten autologen Tumorzellen schwierig expandiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und Galektin-3 in den Tumorzellen einzeln oder in Kombination dafür verantwortlich waren, dass in Kokultur von Tumorzellen von Melanompatienten mit autologen PBMZ der Expansionsfaktor von autologen Tumor-spezifischen T Zellen sehr gering war. Durch Inhibition von IDO oder durch Knockout von Galektin-3 in den Tumorzellen über CRISPR/CAS konnte die Expansion Tumor-spezifischer T Zellen wieder hergestellt werden (Melief et al., 2017). Auch andere PDAC Zellen inhibierten die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen, wobei die Proliferationsinhibition nicht in allen Fällen mit der Expression von Galektin-3 korrelierte. Panc89 Zellen, die z.B. eine geringe Galektin-3 Expression zeigten, inhibierten die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen stark. Dies könnte z.B. an der Expression von FoxP3 liegen. Panc89 Zellen inhibierten ebenfalls die Proliferation von  $CD4^+ \alpha\beta$  T Zellen, die nach Herunterregulation von FoxP3 über siRNA teilweise wieder hergestellt werden konnte (Hinz et al., 2007). Auch andere Enzyme wie IDO oder COX-2 sind in PDAC Zellen teilweise überexprimiert oder werden durch IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ , welche nach Aktivierung von  $\gamma\delta$  T Zellen freigesetzt werden, in PDAC Zellen hochreguliert. Dadurch kommt es zur Akkumulation von proliferationsinhibierenden Substanzen wie Kynurenin oder PGE2, die dann die Proliferation von T Zellen inhibieren können (Daten nicht gezeigt). Die Freisetzung von

#### 4.4 Galektine inhibieren die Proliferation von T Zellen

PGE<sub>2</sub> und eine Überexpression von COX2 spielt insbesondere bei Colo357 Zellen eine Rolle (Gonnermann et al., 2015). Bei Panc89 Zellen gibt es erste Hinweise, dass neben FoxP3 auch IDO eine Rolle in der Proliferationsinhibition spielt. Die Inhibition von IDO in Panc89 Zellen führte zu einer teilweisen Wiederherstellung der Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen in Kokultur mit Panc89 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Auch Ovarialkarzinom Zellen inhibierten die Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen und setzten Galektin-3 frei. Passend zu diesem Ergebnis konnte beobachtet werden, dass in Tumoren von Ovarialkarzinom Patientinnen deutlich weniger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen vorhanden waren als im Aszites oder im Blut derselben Patientinnen (siehe Abbildung 3.32). Dies legt die Vermutung nahe, dass es auch *in vivo* Mechanismen gibt, die die Proliferation von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen inhibieren. Möglicherweise spielt dabei auch Galektin-3 eine Rolle. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu analysieren, ob Galektin-3 auch die Proliferation von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen beeinflusst. Der beobachtete Anstieg von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen in Tumoren von Ovarialkarzinom Patientinnen lässt jedoch vermuten, dass Galektin-3 die Proliferation von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellen nicht inhibiert. Andererseits könnte diese Beobachtung auch durch eine erhöhte V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T Zellinfiltration in den Tumor im Vergleich zu V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen erklärt werden.

In der Interaktion von Tumorzellen und T Zellen spielen Integrine eine besondere Rolle. Insbesondere die Interaktion von ICAM-1 mit LFA-1 ist wichtig für die Lyse von Tumorzellen durch  $\gamma\delta$  T Zellen (Guo et al., 2005; Shojaei et al., 2009). Interessanterweise ist eine Interaktion von Galektin-3 mit Komponenten von LFA-1 in Makrophagen beschrieben (Dong and Hughes, 1997). Auch für andere Integrine wie  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 Integrin oder  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Integrin (CD29/CD49c) ist eine Interaktion mit Galektin-3 gezeigt (Fukushi et al., 2004; Ochieng et al., 1998b). Die Bindung von Galektin-3 an  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Integrin ist dabei abhängig von der Glykosylierung des Integrins durch Mgat5. Durch die Bindung von Galektin-3 an  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Integrin wird in humanen Cornea-Epithelzellen über die *focal adhesion kinase* (FAK) und den Rac1-Signalweg die Formierung von Lamellopodien und somit die epitheliale Zellmigration induziert (Saravanan et al., 2009). Avdalovic et al. (1993) konnten allerdings keine Expression von  $\alpha$ 3 Integrin auf kurzzeit aktivierten  $\gamma\delta$  T Zellen beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten unsere Analysen, dass  $\alpha$ 3 Integrin auf ruhenden  $\gamma\delta$  T Zellen exprimiert ist. Möglicherweise wird das Integrin nach Aktivierung herunterreguliert oder die von Avdalovic und Kollegen verwendeten Antikörper zeigten eine nicht ausreichende Markierung (Avdalovic et al., 1993). Um zu überprüfen, ob Integrine in der Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen innerhalb der PBMZ durch PancTu-I Zellen eine Rolle spielen, wurden neutralisierende Antikörper verwendet um die mögliche Bindung von Galektin-3 an Integrine zu blockieren. Hierbei hoben Antikörper gegen  $\beta$ 1-Integrin und gegen

#### 4 Diskussion

$\alpha 3$ -Integrin sowohl alleine als auch in Kombination die Proliferationsinhibition durch PancTu-I Zellen teilweise auf. Die Vorinkubation mit anti- $\alpha 3$ -Integrin zeigte dabei einen stärkeren Effekt, was darauf hindeutet, dass hier möglicherweise die Bindungsstelle von Galektin-3 liegen könnte. Auch in der Literatur ist ein Einfluss von  $\alpha 3\beta 1$  Integrin auf die Proliferation beschrieben. Chang et al. (1995) konnten einen kostimulatorischen Effekt nach CD3 Stimulation von humanen Thymozyten beobachten, welcher durch Zugabe von Antikörpern gegen  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  Integrin aufgehoben werden konnte. Die Bindung von Galektin-3 an  $\alpha 3$  Integrin könnte einen proliferationsfördernden Effekt des Integrins auf  $\gamma\delta$  T Zellen verhindern. Wird die Interaktion von  $\alpha 3\beta 1$  Integrin mit Galektin-3 durch mAk verhindert, könnte dies ebenfalls einen Einfluss auf Effekte durch  $\alpha 3\beta 1$  Integrin haben. Dies könnte eine Erklärung für die nur unvollständige Aufhebung der Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen durch PancTu-I Zellen darstellen. Ob auch die Proliferationsinhibition durch rekombinantes Galektin-3 durch die neutralisierenden Antikörper aufgehoben wird, wurde in vorliegender Arbeit nicht untersucht. Die Bindung von Galektin-3 an  $\beta 1$ -Integrin könnte auch für die PDAC Zellen eine Rolle spielen. Mardagant und Kollegen konnten z.B. zeigen, dass Galektin-3 in chimären GE11 Zellen über  $\beta 1$ -Integrin induziert wird. Dies geschah über die Demethylierung des Galektin-3 Promotors, wodurch die Galektin-3 Transkription verstärkt wurde. Dieser Feedback-Mechanismus führte zu erhöhter Zelladhäsion und Migration (Mardagant et al., 2012). Wie in vorliegender Arbeit beschrieben setzten PDAC Zellen (PancTu-I Zellen) ebenfalls Galektin-3 frei, wenn sie in Kontakt mit T Zellen kamen. Diese Freisetzung könnte auf der einen Seite zu einer Inhibition der T Zellen führen, kann aber auch auf der anderen Seite ein Mechanismus sein, der die Tumorzellen selbst zu erhöhter Proliferation oder zu verstärkter Zelladhäsion anregt. Zusätzlich könnte der Mechanismus dafür sorgen, dass freigesetztes Galektin-3 nachgebildet wird und somit weiteres Galektin-3 für die Freisetzung zur Verfügung steht.

Eine Immunologische Synapse zwischen T Zelle und APZ oder Zielzelle besteht im Normalfall aus verschiedenen angeordneten Proteinclustern, die dann die sogenannte *bull's eye structure* bilden. Diese Proteincluster oder auch supramolekularen Aktivierungscluster (*supramolecular activation cluster*, SMAC) werden in zentralen (cSMAC), peripheren (pSMAC) und distalen (dSMAC) Aktivierungscluster unterteilt. Der TZR befindet sich zusammen mit der Proteinkinase C und der zur Src Familie gehörenden Tyrosinkinase Lck im cSMAC, wohingegen sich Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1/LFA-1 im pSMAC anlagern. Rund um den pSMAC akkumuliert Aktin, welches den dSMAC bildet (zusammengefasst in Dieckmann et al., 2016). Auch Galektin-3 spielt eine Rolle bei der Ausbildung einer Synapse. Dies könnte eine weitere Möglichkeit der Proliferationsinhibition von  $\gamma\delta$  T Zellen durch Galektin-3 darstellen. Die  $\beta 1,6$ -N-Acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5) ist eine Glykosyltransferase, die die Ver-



#### 4.4 Galektine inhibieren die Proliferation von T Zellen

zweigung von N-Glykanen initiiert und somit N-Acetylactosamin (LacNAc)-Zuckerstrukturen an Proteine wie den TZR bindet. An diese Zuckerstrukturen kann Galektin-3 binden und verhindert damit das Zusammenlagern vieler TZRs. Demetriou und Kollegen konnten in einer Studie in Mäusen zeigen, dass der Knockout von MAGT5 die Bindung von Galektin-3 an den TZR verhinderte, was zu verbessertem Zusammenlagern der TZRs nach CD3 Stimulation führte. Letztendlich resultierte daraus eine erhöhte ZAP70 Phosphorylierung und verbesserte T Zellaktivierung sowie gesteigerte T Zellproliferation (Demetriou et al., 2001). Auch durch Tumorzellen freigesetztes Galektin-3 könnte an den TZR binden und somit die Schwelle zur T Zellaktivierung erhöhen. Dies könnte zur Inhibition der Proliferation von  $\gamma\delta$  T Zellen durch Tumorzellen beitragen.

Die Protein Tyrosinphosphatase CD45 ist ebenfalls an der Aktivierung von T Zellen beteiligt und besitzt auch  $\beta$ 1,6-GlcNAc-verzweigte Zuckerstrukturen, an welche Galektin-3 binden kann (Sato et al., 1993b). Das Galektin-Netzwerk, das sowohl an CD45 als auch an den TZR bindet, sorgt dafür, dass diese in einer Mikrodomänenstruktur lokalisiert sind (Chen et al., 2007). Diese räumliche Nähe führt zu einem reduzierten TZR-Signaling (He et al., 2002). Nach T Zellaktivierung reduziert sich die CD45 Menge in der Nähe des TZRs (Edmonds and Ostergaard, 2002). Dies führt zu einem erhöhten TZR-Signaling in murinen CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen, das vermutlich über die zur Src Familie gehörende Tyrosinkinase Lck vermittelt ist (Chen et al., 2007). Lck, das in  $\alpha\beta$  T Zellen meist mit CD4 assoziiert ist, ist auch für ein starkes Signal des  $\gamma\delta$  TZR wichtig (Laird and Hayes, 2010). Durch die Freisetzung von Galektin-3 bei Zell-Zellkontakt zwischen PDAC Zelle und T Zelle erhöht sich die Galektin-3 Menge in der Umgebung der Synapse deutlich. Dies könnte zu einer Störung der Lokalisation von CD45 und des TZR führen, was in einem reduzierten T Zell-Signaling und damit in reduzierter T Zellaktivierung resultieren könnte. Auch bei der Kostimulation von T Zellen könnte Galektin-3 eine inhibitorische Funktion haben. Das kostimulatorische Molekül CD28 besitzt Polylaktosamin-Strukturen, die von der  $\beta$ 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 2 ( $\beta$ 3GnT2) synthetisiert werden und an die Galektin-3 binden könnte. In Knockout-Mäusen für  $\beta$ 3GnT2 war kein Polylaktosamin mehr an CD28 zu finden und das Signaling nach TZR/CD28 Stimulation verstärkt. Außerdem zeigte sich eine erhöhte T Zell-Proliferation (Togayachi et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass in Kokultur von PancTu-I Zellen und kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen nur wenige Synapsen ausgebildet werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hindeuten, dass Galektin-3 die Ausbildung von Synapsen zwischen PancTu-I Zellen und kurzzeit aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen behindert. Auch ein *kiss and run* Mechanismus, bei dem die  $\gamma\delta$  T Zellen nur kurz an ihre Zielzelle binden, diese abtöten und dann weiter zur nächsten Zielzelle wandern, ist denkbar. In PancTu-I Zellen

#### 4 Diskussion

konnte eine Relokalisation von Galektin-3 in Richtung der Zellperipherie kurz nach Beginn der Kokultur mit  $\gamma\delta$  T Zellen beobachtet werden (Abschnitt 3.10). Dies könnte z.B. die Proliferation von T Zellen inhibieren. Wang et al. (2014) konnten z.B. zeigen, dass von HeLa- oder Brustkrebszellen freigesetztes Galektin-3 an den aktivierenden NK-Rezeptor NKp30 bindet und darüber die zytotoxische Aktivität von NK Zellen reduziert. Tsuboi und Kollegen konnten auch eine Bindung von Galektin-3 an den NKG2D Liganden MIC-A auf NK Zellen zeigen, wodurch die Affinität von MIC-A für NKG2D verringert wurde. Dadurch wurde die Aktivierung der humanen NK Zellen deutlich reduziert (Tsuboi et al., 2011). Auch Peng und Kollegen konnten zeigen, dass Galektin-3 die zytotoxische Aktivität von tumorreaktiven  $CD8^+ \alpha\beta$  T Zellen inhibiert (Peng et al., 2008). Demotte et al. (2014) konnten ergänzend zeigen, dass humane  $CD8^+$  TIL aus verschiedensten Tumorentitäten Galektin-3 auf der Oberfläche aufwiesen. Nach Behandlung mit Galektin-3 Inhibitoren konnten die TIL deutlich höhere Mengen  $IFN-\gamma$  freisetzen und zeigten eine deutlich verstärkte zytotoxische Aktivität. Demotte et al. (2008) führen dies auf einen Verlust der Kolo-kalisation zwischen TZR und CD8, der über Galektin-3 vermittelt wird, zurück. Petit et al. (2016) konnten ergänzend zeigen, dass Galektin-3 die Etablierung einer Synapse zwischen TIL und Zielzellen verhindert. Die Autoren führten dies auf eine defekte Adhäsion über LFA-1 zurück. Durch diese unvollständige Synapse wurden zwar intrazellulär Zytokine wie  $IFN-\gamma$  gebildet, diese konnten aber nicht freigesetzt werden (Petit et al., 2016). Wir konnten beobachten, dass T Zellen aus dem Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen eine stärkere Expression von  $IFN-\gamma$  zeigten als T Zellen aus dem Blut derselben Patientinnen (Daten nicht gezeigt). Ob die Freisetzung dieses intrazellulären  $IFN-\gamma$  in unseren Experimenten ebenfalls inhibiert war, wurde allerdings nicht untersucht.

In unseren Analysen der zytotoxischen Aktivität von kurzzeit aktivierten  $\gamma\delta$  und  $\alpha\beta$  T Zellen auf Panc1 Zellen wurden diese nur in der RTCA-Analyse leicht besser lysiert, wenn Galektin-3 herunterreguliert wurde. Im  $^{51}Cr$ -Freisetzungstest, bei dem auch unterschiedliche Effektor-Zielzell-Verhältnisse verwendet wurden, war dieser Effekt nicht mehr so deutlich zu beobachten. Auch bei PancTu-I Zellen zeigten sich keine Effekte einer Herunterregulation von Galektin-3 auf die Lyse durch kurzzeit aktivierte  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen. Nach Restimulation der kurzzeit aktivierten  $\gamma\delta$  T Zellen mit dem bsAk [(HER2) $_2$ xV $\gamma9$ ] war weder bei Panc1 Zellen noch bei PancTu-I Zellen ein Unterschied in der Lyse zwischen Zellen mit vorhandener oder herunterregulierter Galektin-3 Expression zu beobachten. Die kurzzeit aktivierte T Zellen für diese Experimente wurden von gesunden Spendern generiert. Auch Demotte und Kollegen beobachteten keinen steigernden Effekt auf die zytotoxische Aktivität von humanen  $CD8^+ \alpha\beta$  T Zellen aus dem Blut durch Behandlung mit Galektin-3 Inhibitoren. In humanen TIL hingegen steigerte eine Inkubation mit Galektin-3 Inhibitor die  $IFN-\gamma$  Freisetzung (Demotte et al.,

2014). Dies deutet darauf hin, dass T Zellen Galektin-3 möglicherweise über einen längeren Zeitraum ausgesetzt sein müssen, um zytotoxische Effektorfunktionen zu modulieren.

In einem Lymphom-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 die CD20-abhängige Phagozytose nach Rituximab-Therapie (gegen CD20 gerichteter Antikörper) verhindert (Lykken et al., 2016). Dies könnte darauf hindeuten, dass Galektine auch in der Therapie mit anderen Antikörpern wie z.B. Immun-Checkpoint-Inhibitoren eine Rolle spielen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Galektin-3 murine CD8<sup>+</sup> T Zellen über Bindung an das Immun-Checkpoint-Molekül *lymphocyte activation gene* (LAG)-3 inhibiert (Kouo et al., 2015). Über diesen Mechanismus könnte Galektin-3 ebenfalls die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T Zellen, die auch CD8 exprimieren können, verhindern (Mingari et al., 1988). Erste klinische Studien für das Melanom, in denen eine Immun-Checkpoint-Blockade in Kombination mit Galektin-3 Inhibitor getestet werden soll, rekrutieren bereits Patienten (clinicaltrial NCT02575404 und NCT02117362).

## 4.5 Ausblick

Für viele solide Tumore wie das PDAC oder das Ovarialkarzinom haben sich die Überlebensraten in den letzten Jahren nicht gravierend verändert. Ob eine Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die z.B. beim Melanom erhebliche Erfolge erzielen, die Überlebensraten auch für das PDAC oder das Ovarialkarzinom verbessern kann, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen und Diskussionen (Aglietta et al., 2014). Auch bsAk könnten eine Möglichkeit darstellen die immunsuppressive Mikroumgebung solider Tumore zu überkommen. Hierdurch könnten vorher nicht reaktive T Zellen reaktiviert und somit eine Tumorantwort induziert werden. Werden  $\gamma\delta$  T Zellen über bsAk aktiviert, setzen sie T<sub>H</sub>1 Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  frei, welche die durch verminderte Anzahl an CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen verringerte Menge an T<sub>H</sub>1 Zytokinen in der Tumorumgebung kompensieren könnten (Helm et al., 2014c; Oberg et al., 2014). Möglicherweise könnten bsAk auch z.B. im Tumor nachgewiesene IL-17 produzierende  $\gamma\delta$  T Zellen zu einer Freisetzung von T<sub>H</sub>1 Zytokinen anregen (Wu et al., 2014). Eine weitere mögliche Therapieoption für solide Tumore stellt der adoptive Zelltransfer dar. Hierfür könnte neben CAR T Zellen insbesondere auch ein adoptiver Transfer von  $\gamma\delta$  T Zellen möglicherweise in Kombination mit bsAk eine Option sein.  $\gamma\delta$  T Zellen haben den Vorteil, dass sie HLA-unabhängig ihre Antigene erkennen, eine antigenpräsentierende Funktion besitzen, eine verminderte *graft versus host* Reaktion zeigen und IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  freisetzen. Auch beim adoptiven Zelltransfer könnten Resistenzmechanismen eine Immunantwort gegenüber Tumoren vermindern.

#### 4 Diskussion

Galektin-3 scheint insbesondere die zytotoxischen Effektorfunktionen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zu inhibieren (Demotte et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine verringerte Proliferation von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen in Gegenwart von Galektin-3 beobachtet werden. Mit diesem Effekt hängt möglicherweise die verringerte Frequenz von V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen im Tumor von Ovarialkarzinom Patientinnen zusammen. Wurden  $\gamma\delta$  T Zellen hingegen wie für einen adoptiven Transfer *in vitro* expandiert, hatte Galektin-3 in anschließenden Zytotoxizitätsassays keinen Einfluss auf die Lyse von Tumorzellen. Dies deutet darauf hin, dass Galektin-3 zwar ein Resistenzmechanismus von Tumorzellen ist, dieser aber durch adoptiven Transfer von  $\gamma\delta$  T Zellen allein oder in Kombination mit bsAk überwunden werden könnte.

# 5 Zusammenfassung

## 5.1 Zusammenfassung

Galektin-3 ist ein  $\beta$ -Galaktosid-bindendes Protein, das je nach Lokalisation unterschiedlichste Funktionen aufweist. Eine immunsuppressive Funktion von Galektin-3 wird im Kontext der Tumorimmunologie diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Galektin-3 in der Interaktion von Tumorzellen mit T Zellen, insbesondere den für eine Immuntherapie interessanten  $\gamma\delta$  T Zellen, untersucht. Galektin-3 wird sowohl von Tumorzellen als auch von T Zellen exprimiert, wird von diesen jedoch unter Zellkulturbedingungen nur in geringen Mengen freigesetzt. In Kokultur von T Zellen zusammen mit Tumorzellen zeigte sich dagegen eine stark erhöhte Freisetzung von Galektin-3. Durch Herunterregulation von Galektin-3 mit siRNA konnten die Tumorzellen als Quelle des freigesetzten Galektin-3 in Kokultur identifiziert werden. Es zeigte sich, dass Galektin-3 die Proliferation von  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen inhibiert. Zusätzlich stellte sich heraus, dass  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen in Gegenwart einiger PDAC Zellen und Ovarialkarzinomzellen nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren und dass Galektin-3 sowie  $\alpha3\beta1$  Integrin hieran beteiligt sind. Um zu überprüfen, ob diese Daten eine *in vivo* Relevanz besitzen, wurde die Infiltration von  $\gamma\delta$  T Zellen sowie die Freisetzung von Galektin-3 durch primäre Ovarialkarzinom Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass Galektin-3 ebenfalls von primären Ovarialkarzinom Zellen in Kokultur mit T Zellen freigesetzt wird. Damit im Einklang steht die beobachtete reduzierte Frequenz von  $V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen im Tumor und im Aszites von Ovarialkarzinom Patientinnen. *In vitro* expandierte  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen wurden hingegen durch Galektin-3 nicht beeinflusst. Galektin-3 induzierte in diesem Fall weder Zelltod noch modulierte es die zytotoxische Aktivität von *in vitro* expandierten  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen gegenüber Tumorzellen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Galektin-3 in der Tumorumgebung eine immunsuppressive Funktion besitzt. Die Ergebnisse legen allerdings nahe, dass die immunsuppressive Wirkung von Galektin-3 durch einen adoptiven Transfer *in vitro* expandierter  $V\gamma9V\delta2$   $\gamma\delta$  T Zellen allein oder in Kombination mit bispezifischen Antikörpern überkommen werden könnte.

## 5.2 Summary

Galectin-3 is a  $\beta$ -galactoside-binding protein which has different functions depending on its localization. An immunosuppressive function of galectin-3 has been discussed in the context of tumor-immunology. Within the framework of this thesis, the influence of galectin-3 on the interaction of tumor cells with T cells, especially with  $\gamma\delta$  T cells was analyzed.  $\gamma\delta$  T cells are of great interest for an immunotherapy of solid tumors due to their HLA independent recognition of antigens and their reduced *graft versus host* reaction. Galectin-3 is expressed by tumor cells and T cells but is only released in small amounts by either cell population. However, during coculture of T cells together with tumor cells large amounts of galectin-3 were released. Knockdown of galectin-3 in tumor cells showed that tumor cells were the source of galectin-3 in coculture with T cells.

Soluble galectin-3 inhibited the proliferation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells. In addition, some PDAC cells and ovarian cancer cells also inhibited the proliferation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells. Further experiments demonstrated that galectin-3 and the  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin were involved in this inhibition. To evaluate whether these effects are relevant *in vivo*, the release of galectin-3 by primary ovarian cancer cells and the infiltration of  $\gamma\delta$  T cells in tumors of ovarian cancer patients were analyzed. Primary ovarian cancer cells also released galectin-3 upon coculture with T cells. Furthermore, the frequency of V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells was lower in tumor and ascites than in blood of ovarian cancer patients. In contrast to these observations, galectin-3 did not influence *in vitro* expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells. Galectin-3 neither induced cell death of *in vitro* expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells, nor did galectin-3 change the cytotoxic activity of *in vitro* expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells towards tumor cells.

Taken together, the results of this thesis indicate that galectin-3 has an immunosuppressive function in the tumor microenvironment. Additionally, the results suggest that this immunosuppressive function can be overcome by an adoptive transfer of *in vitro* expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells, alone or in combination with bispecific antibodies.

# Literaturverzeichnis

- Acar-Perk, B., Brautigam, K., Grunewald, R., Schmutzler, A., Schem, C., Arnold, N. K., Jonat, W., and Weimer, J. (2010). The t(14;15) in mouse strain CBA/CaH-T(14;15)6Ca/J causes a break in the ADAMTS12 gene. *Comparative Medicine*, 60:118–22.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*, 8:942–9.
- Adrain, C., Murphy, B. M., and Martin, S. J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:4663–73.
- Aglietta, M., Barone, C., Sawyer, M. B., Moore, M. J., Miller, W. H. J., Bagala, C., Colombi, F., Cagnazzo, C., Gioeni, L., Wang, E., Huang, B., Fly, K. D., and Leone, F. (2014). A phase I dose escalation trial of tremelimumab (CP-675,206) in combination with gemcitabine in chemotherapy-naive patients with metastatic pancreatic cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25:1750–5.
- Ahmad, N., Gabius, H.-J., André, S., Kaltner, H., Sabesan, S., Roy, R., Liu, B., Macaluso, F., and Brewer, C. F. (2004). Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:10841–10847.
- Aoki, T., Matsushita, H., Hoshikawa, M., Hasegawa, K., Kokudo, N., and Kakimi, K. (2017). Adjuvant combination therapy with gemcitabine and autologous  $\gamma\delta$  T-cell transfer in patients with curatively resected pancreatic cancer. *Cytotherapy*, 19:473–485.
- Asakura, H., Kashio, Y., Nakamura, K., Seki, M., Dai, S., Shirato, Y., Abedin, M. J., Yoshida, N., Nishi, N., Imaizumi, T., Saita, N., Toyama, Y., Takashima, H., Nakamura, T., Ohkawa, M., and Hirashima, M. (2002). Selective eosinophil adhesion to fibroblast *via* IFN-gamma-induced galectin-9. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169:5912–5918.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 190(7):995–1004.

## Literaturverzeichnis

- Avdalovic, M., Fong, D., and Formby, B. (1993). Adhesion and costimulation of proliferative responses of human gamma delta T cells by interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin. *Immunology Letters*, 35:101–108.
- Bachhawat-Sikder, K., Thomas, C. J., and Surolia, A. (2001). Thermodynamic analysis of the binding of galactose and poly-N-acetyllactosamine derivatives to human galectin-3. *FEBS Letters*, 500:75–79.
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., De-poortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., and David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14:677–685.
- Balan, V., Nangia-Makker, P., Schwartz, A. G., Jung, Y. S., Tait, L., Hogan, V., Raz, T., Wang, Y., Yang, Z. Q., Wu, G. S., Guo, Y., Li, H., Abrams, J., Couch, F. J., Lingle, W. L., Lloyd, R. V., Ethier, S. P., Tainsky, M. A., and Raz, A. (2008). Racial disparity in breast cancer and functional germ line mutation in galectin-3 (rs4644): a pilot study. *Cancer Research*, 68:10045–10050.
- Bax, M., García-Vallejo, J. J., Jang-Lee, J., North, S. J., Gilmartin, T. J., Hernández, G., Crocker, P. R., Leffler, H., Head, S. R., Haslam, S. M., Dell, A., and van Kooyk, Y. (2007). Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179:8216–8224.
- Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M., and Koup, R. A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods*, 281:65–78.
- Bi, S., Earl, L. A., Jacobs, L., and Baum, L. G. (2008). Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:12248–12258.
- Bookman, M. A., Darcy, K. M., Clarke-Pearson, D., Boothby, R. A., and Horowitz, I. R. (2003). Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the gynecologic oncology group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21:283–290.
- Bossi, G. and Griffiths, G. M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature Medicine*, 5:90–6.



- Brandes, M., Willimann, K., Bioley, G., Lévy, N., Eberl, M., Luo, M., Tampé, R., Lévy, F., Romero, P., and Moser, B. (2009). Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8<sup>+</sup> alphabeta T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:2307–2312.
- Brandes, M., Willimann, K., Lang, A. B., Nam, K.-H., Jin, C., Brenner, M. B., Morita, C. T., and Moser, B. (2003). Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood*, 102:3693–3701.
- Brandes, M., Willimann, K., and Moser, B. (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 309:264–268.
- Brustmann, H. (2008). Epidermal growth factor receptor expression in serous ovarian carcinoma: an immunohistochemical study with galectin-3 and cyclin D1 and outcome. *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 27:380–389.
- Buick, R. N., Pullano, R., and Trent, J. M. (1985). Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Research*, 45:3668–3676.
- Caccamo, N., Battistini, L., Bonneville, M., Poccia, F., Fournié, J. J., Meraviglia, S., Borsellino, G., Kroczyk, R. A., La Mendola, C., Scotet, E., et al. (2006). CXCR5 identifies a subset of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *The Journal of Immunology*, 177(8):5290–5295.
- Califice, S., Castronovo, V., Bracke, M., and van den Brûle, F. (2004). Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*, 23:7527–7536.
- Capietto, A.-H., Martinet, L., and Fournié, J.-J. (2011). How tumors might withstand  $\gamma\delta$  T-cell attack. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 68:2433–2442.
- Carbone, F. R. and Bevan, M. J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 171:377–387.
- Carlsson, S. R. and Fukuda, M. (1990). The polylectosaminoglycans of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2. Localization on the peptide backbones. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:20488–20495.

## Literaturverzeichnis

- Carvajal-Hausdorf, D. E., Schalper, K. A., Bai, Y., Black, J., Santin, A. D., and Rimm, D. L. (2017). Objective, domain-specific HER2 measurement in uterine and ovarian serous carcinomas and its clinical significance. *Gynecologic Oncology*, 145:154–158.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 257:7847–7851.
- Castells, M., Milhas, D., Gandy, C., Thibault, B., Rafii, A., Delord, J.-P., and Couderc, B. (2013). Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death & Disease*, 4:e887.
- Chan, K. S. and Kaur, A. (2007). Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8+ T lymphocytes in rhesus macaques. *Journal of Immunological Methods*, 325:20–34.
- Chang, A. C., Salomon, D. R., Wadsworth, S., Hong, M. J., Mojcik, C. F., Otto, S., Shevach, E. M., and Coligan, J. E. (1995). Alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 1 integrins mediate laminin/merosin binding and function as costimulatory molecules for human thymocyte proliferation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154:500–510.
- Chang, H.-C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.-N., Han, L., Nguyen, E. T., Robertson, M. J., Perumal, N. B., Tepper, R. S., Nutt, S. L., and Kaplan, M. H. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology*, 11:527–534.
- Chen, H.-Y., Fermin, A., Vardhana, S., Weng, I.-C., Lo, K. F. R., Chang, E.-Y., Maverakis, E., Yang, R.-Y., Hsu, D. K., Dustin, M. L., and Liu, F.-T. (2009). Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:14496–14501.
- Chen, H.-Y., Sharma, B. B., Yu, L., Zuberi, R., Weng, I.-C., Kawakami, Y., Kawakami, T., Hsu, D. K., and Liu, F.-T. (2006). Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177:4991–4997.
- Chen, I.-J., Chen, H.-L., and Demetriou, M. (2007). Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:35361–35372.

- Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H., and Blazar, B. R. (2008). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181:5396–5404.
- Chitadze, G., Lettau, M., Bhat, J., Wesch, D., Steinle, A., Fürst, D., Mytilineos, J., Kalthoff, H., Janssen, O., Oberg, H.-H., and Kabelitz, D. (2013). Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the  $\alpha$  disintegrin and metalloproteases 10 and 17. *International Journal of Cancer*, 133:1557–1566.
- Chitadze, G., Lettau, M., Luecke, S., Wang, T., Janssen, O., Furst, D., Mytilineos, J., Wesch, D., Oberg, H.-H., Held-Feindt, J., and Kabelitz, D. (2016). NKG2D- and T-cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human  $\gamma\delta$  T cells: Modulation by temozolomide and  $\alpha$  disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors. *Oncoimmunology*, 5:e1093276.
- Choudhuri, K., Llodrá, J., Roth, E. W., Tsai, J., Gordo, S., Wucherpfennig, K. W., Kam, L. C., Stokes, D. L., and Dustin, M. L. (2014). Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature*, 507:118–123.
- Coffey, F., Alabyev, B., and Manser, T. (2009). Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity*, 30(4):599–609.
- Cordova, A., Toia, F., La Mendola, C., Orlando, V., Meraviglia, S., Rinaldi, G., Todaro, M., Cicero, G., Zichichi, L., Donni, P. L., Caccamo, N., Stassi, G., Dieli, F., and Moschella, F. (2012). Characterization of human  $\gamma\delta$  T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLOS ONE*, 7:e49878.
- Cortesi, L., Rossi, E., Della Casa, L., Barchetti, A., Nicoli, A., Piana, S., Abrate, M., La Sala, G. B., Federico, M., and Iannone, A. (2011). Protein expression patterns associated with advanced stage ovarian cancer. *Electrophoresis*, 32:1992–2003.
- Craig, S. S., Krishnaswamy, P., Irani, A. M., Kepley, C. L., Liu, F. T., and Schwartz, L. B. (1995). Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. *The Anatomical Record*, 242:211–219.
- Dagher, S. F., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:1213–1217.

## Literaturverzeichnis

- Dam, T. K. and Brewer, C. F. (2010). Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology*, 20:270–279.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I.-C., Khoury, S., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2008). IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology*, 9:1347–1355.
- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J. W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*, 409:733–739.
- Demotte, N., Bigirimana, R., Wieërs, G., Stroobant, V., Squifflet, J.-L., Carrasco, J., Thielemans, K., Baurain, J.-F., Van Der Smissen, P., Courtoy, P. J., and van der Bruggen, P. (2014). A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20:1823–1833.
- Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P. J., Van Der Smissen, P., Colau, D., Luescher, I. F., Hivroz, C., Nicaise, J., Squifflet, J.-L., Mourad, M., Godelaine, D., Boon, T., and van der Bruggen, P. (2008). Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity*, 28:414–424.
- Demotte, N., Wieërs, G., Van Der Smissen, P., Moser, M., Schmidt, C., Thielemans, K., Squifflet, J.-L., Weynand, B., Carrasco, J., Lurquin, C., Courtoy, P. J., and van der Bruggen, P. (2010). A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Research*, 70:7476–7488.
- Deusch, K., Lüling, F., Reich, K., Classen, M., Wagner, H., and Pfeffer, K. (1991). A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the  $\gamma\delta$  T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V $\delta$ 1 gene segment. *European Journal of Immunology*, 21(4):1053–1059.
- Devilder, M.-C., Maillet, S., Bouyge-Moreau, I., Donnadieu, E., Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). Potentiation of antigen-stimulated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176:1386–1393.

- Dieckmann, N. M. G., Frazer, G. L., Asano, Y., Stinchcombe, J. C., and Griffiths, G. M. (2016). The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance. *Journal of Cell Science*, 129:2881–2886.
- Dieli, F., Gebbia, N., Poccia, F., Caccamo, N., Montesano, C., Fulfaro, F., Arcara, C., Valerio, M. R., Meraviglia, S., Di Sano, C., Sireci, G., and Salerno, A. (2003a). Induction of gamma-delta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood*, 102:2310–1.
- Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C., and Salerno, A. (2003b). Differentiation of effector/memory V $\delta$ 2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *The Journal of Experimental Medicine*, 198:391–7.
- Dieli, F., Vermijlen, D., Fulfaro, F., Caccamo, N., Meraviglia, S., Cicero, G., Roberts, A., Buccheri, S., D'Asaro, M., Gebbia, N., Salerno, A., Eberl, M., and Hayday, A. C. (2007). Targeting human  $\gamma\delta$  T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 67:7450–7.
- Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews. Immunology*, 8:337–348.
- Dong, S. and Hughes, R. C. (1997). Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconjugate Journal*, 14:267–274.
- Dumic, J., Dabelic, S., and Flögel, M. (2006). Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:616–635.
- Ebrahim, A. H., Alalawi, Z., Mirandola, L., Rakhshanda, R., Dahlbeck, S., Nguyen, D., Jenkins, M., Grizzi, F., Cobos, E., Figueroa, J. A., and Chiriva-Internati, M. (2014). Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Annals of Translational Medicine*, 2:88.
- Edmonds, S. D. and Ostergaard, H. L. (2002). Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169:5036–5042.
- Eguia, V., Gonda, T. A., and Saif, M. W. (2012). Early detection of pancreatic cancer. *JOP : Journal of the Pancreas*, 13:131–134.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Balan, E., and Kloog, Y. (2004). Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:34922–34930.

## Literaturverzeichnis

- Ene-Obong, A., Clear, A. J., Watt, J., Wang, J., Fatah, R., Riches, J. C., Marshall, J. F., Chin-Aleong, J., Chelala, C., Gribben, J. G., Ramsay, A. G., and Kocher, H. M. (2013). Activated pancreatic stellate cells sequester CD8<sup>+</sup> T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 145:1121–1132.
- Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., and Bluestone, J. A. (2016). CD28 costimulation: From mechanism to therapy. *Immunity*, 44:973–88.
- Fei, F., Abdel-Azim, H., Lim, M., Arutyunyan, A., von Itzstein, M., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (2013). Galectin-3 in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 27:2385–2388.
- Fei, F., Joo, E. J., Tarighat, S. S., Schiffer, I., Paz, H., Fabbri, M., Abdel-Azim, H., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (2015). B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through galectin-3. *Oncotarget*, 6:11378–11394.
- Fournié, J.-J., Sicard, H., Poupot, M., Bezombes, C., Blanc, A., Romagné, F., Ysebaert, L., and Laurent, G. (2013). What lessons can be learned from  $\gamma\delta$  T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cellular & Molecular Immunology*, 10:35–41.
- Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H.-R. C., Hogan, V., Inohara, H., Kagawa, S., and Raz, A. (2003). CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Research*, 63:8302–8311.
- Fukushi, J.-i., Makagiansar, I. T., and Stallcup, W. B. (2004). NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis *via* engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Molecular Biology of the Cell*, 15:3580–3590.
- Funasaka, T., Raz, A., and Nangia-Makker, P. (2014). Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*, 24:886–891.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews. Immunology*, 4:941–952.
- Gaida, M. M., Bach, S. T., Günther, F., Baseras, B., Tschaharganeh, D. F., Welsch, T., Felix, K., Bergmann, F., Hänsch, G. M., and Wente, M. N. (2012). Expression of galectin-3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology Oncology Research : POR*, 18:299–307.
- Giannopoulos, G., Pavlakis, K., Parasi, A., Kavatzas, N., Tiniakos, D., Karakosta, A., Tzankis, N., and Peros, G. (2008). The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and

- their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. *Anticancer Research*, 28:1875–1881.
- Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., Dominici, M., and Müller, I. (2013). Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, 43:2741–2749.
- Glatzel, A., Wesch, D., Schiemann, F., Brandt, E., Janssen, O., and Kabelitz, D. (2002). Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood  $\gamma\delta$  T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V $\delta$ 2/V $\gamma$ 9  $\gamma\delta$  T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168:4920–9.
- Gober, H.-J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., and De Libero, G. (2003). Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197:163–168.
- Gold, D. V., Gaedcke, J., Ghadimi, B. M., Goggins, M., Hruban, R. H., Liu, M., Newsome, G., and Goldenberg, D. M. (2013). PAM4 enzyme immunoassay alone and in combination with CA 19-9 for the detection of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 119:522–528.
- Gonnermann, D., Oberg, H.-H., Kellner, C., Peipp, M., Sebens, S., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2015). Resistance of cyclooxygenase-2 expressing pancreatic ductal adenocarcinoma cells against  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 4:e988460.
- Goonetilleke, K. S. and Siriwardena, A. K. (2007). Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 33:266–270.
- Grage-Griebenow, E., Jerg, E., Gorys, A., Wicklein, D., Wesch, D., Freitag-Wolf, S., Goebel, L., Vogel, I., Becker, T., Ebsen, M., Rocken, C., Altevogt, P., Schumacher, U., Schafer, H., and Sebens, S. (2014). L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression. *Molecular Oncology*, 8:982–97.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Science*, 279(5357):1737–1740.

## Literaturverzeichnis

- Guo, B. L., Liu, Z., Aldrich, W. A., and Lopez, R. D. (2005). Innate anti-breast cancer immunity of apoptosis-resistant human gammadelta-T cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 93:169–175.
- Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.-M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E. J., Netzer, S., et al. (2012). Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset. *Blood*, 120(11):2269–2279.
- Harrison, S. A., Marri, S. R., Chalasani, N., Kohli, R., Aronstein, W., Thompson, G. A., Irish, W., Miles, M. V., Xanthakos, S. A., Lawitz, E., Noureddin, M., Schiano, T. D., Siddiqui, M., Sanyal, A., Neuschwander-Tetri, B. A., and Traber, P. G. (2016). Randomised clinical study: GR-MD-02, a galectin-3 inhibitor, vs. placebo in patients having non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 44:1183–1198.
- Haudek, K. C., Spronk, K. J., Voss, P. G., Patterson, R. J., Wang, J. L., and Arnoys, E. J. (2010). Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800:181–189.
- Haugk, B. (2010). Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer? *Histopathology*, 57:503–514.
- He, X., Woodford-Thomas, T. A., Johnson, K. G., Shah, D. D., and Thomas, M. L. (2002). Targeting of CD45 protein tyrosine phosphatase activity to lipid microdomains on the T cell surface inhibits TCR signaling. *European Journal of Immunology*, 32:2578–2587.
- Heibein, J. A., Goping, I. S., Barry, M., Pinkoski, M. J., Shore, G. C., Green, D. R., and Blackley, R. C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and bax. *The Journal of Experimental Medicine*, 192:1391–402.
- Helm, O., Held-Feindt, J., Grage-Griebenow, E., Reiling, N., Ungefroren, H., Vogel, I., Krüger, U., Becker, T., Ebsen, M., Röcken, C., Kabelitz, D., Schäfer, H., and Sebens, S. (2014a). Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *International Journal of Cancer*, 135:843–861.
- Helm, O., Held-Feindt, J., Schäfer, H., and Sebens, S. (2014b). M1 and M2: there is no good and bad-How macrophages promote malignancy-associated features in tumorigenesis. *Oncoimmunology*, 3:e946818.



- Helm, O., Mennrich, R., Petrick, D., Goebel, L., Freitag-Wolf, S., Röder, C., Kalthoff, H., Röcken, C., Sipos, B., Kabelitz, D., Schäfer, H., Oberg, H.-H., Wesch, D., and Sebens, S. (2014c). Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLOS ONE*, 9:e94357.
- Himoudi, N., Morgenstern, D. A., Yan, M., Vernay, B., Saraiva, L., Wu, Y., Cohen, C. J., Gustafsson, K., and Anderson, J. (2012). Human gammadelta T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188:1708–16.
- Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R. M., Kollas, A. K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M., and Jomaa, H. (2001). Identification of (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 509:317–322.
- Hinz, S., Pagerols-Raluy, L., Oberg, H.-H., Ammerpohl, O., Grussel, S., Sipos, B., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Ungefroren, H., Saeger, H.-D., Kloppel, G., Kabelitz, D., and Kalthoff, H. (2007). Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Research*, 67:8344–50.
- Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H., and Raz, A. (2001). Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7:661–668.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609):1057–1061.
- Hosseini, G., Keshavarz, M., Ahmadi, S., and Naderi, N. (2013). Synergistic effects of PectaSol-C modified citrus pectin an inhibitor of galectin-3 and paclitaxel on apoptosis of human SKOV-3 ovarian cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14:7561–7568.
- Houot, R., Schultz, L. M., Marabelle, A., and Kohrt, H. (2015). T-cell-based immunotherapy: Adoptive cell transfer and checkpoint inhibition. *Cancer Immunology Research*, 3:1115–22.
- Hughes, R. C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473:172–185.
- Imaizumi, T., Kumagai, M., Sasaki, N., Kurotaki, H., Mori, F., Seki, M., Nishi, N., Fujimoto, K., Tanji, K., Shibata, T., Tamo, W., Matsumiya, T., Yoshida, H., Cui, X.-F., Takanashi, S.,

## Literaturverzeichnis

- Hanada, K., Okumura, K., Yagihashi, S., Wakabayashi, K., Nakamura, T., Hirashima, M., and Satoh, K. (2002). Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 72:486–491.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388:190–195.
- Itohara, S., Farr, A. G., Lafaille, J. J., Bonneville, M., Takagaki, Y., Haas, W., and Tonegawa, S. (1990). Homing of a  $\gamma\delta$  thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature*, 343:754–757.
- Iurisci, I., Tinari, N., Natoli, C., Angelucci, D., Cianchetti, E., and Iacobelli, S. (2000). Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6:1389–1393.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126:1121–1133.
- Iwata, S., Ohashi, Y., Kamiguchi, K., and Morimoto, C. (2000). Beta 1-integrin-mediated cell signaling in T lymphocytes. *Journal of Dermatological Science*, 23:75–86.
- Jakubowska, K., Pryczynicz, A., Januszewska, J., Sidorkiewicz, I., Kemon, A., Niewiński, A., Lewczuk, L., Kędra, B., and Guzińska-Ustymowicz, K. (2016). Expressions of matrix metalloproteinases 2, 7, and 9 in carcinogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Disease Markers*, 2016:9895721.
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., and Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. *Lancet (London, England)*, 384:1376–1388.
- Jiang, H.-B., Xu, M., and Wang, X.-P. (2008). Pancreatic stellate cells promote proliferation and invasiveness of human pancreatic cancer cells *via* galectin-3. *World Journal of Gastroenterology*, 14:2023–2028.
- Jiang, J.-T., Wu, C.-P., Deng, H.-F., Lu, M.-Y., Wu, J., Zhang, H.-Y., Sun, W.-H., and Ji, M. (2004). Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 10:1675–1677.

- Joo, H. G., Goedegebuure, P. S., Sadanaga, N., Nagoshi, M., von Bernstorff, W., and Eberlein, T. J. (2001). Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 69:555–564.
- Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martínez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.-A., Chamailard, M., Trottein, F., and Poulain, D. (2006). Specific recognition of candida albicans by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177:4679–4687.
- Jung, M., Koo, J. S., Moon, Y. W., Park, B.-W., Kim, S. I., Park, S., Lee, S. H., Hong, S., Rha, S. Y., Chung, H. C., Kim, J. H., and Sohn, J. (2012). Overexpression of class III beta tubulin and amplified HER2 gene predict good response to paclitaxel and trastuzumab therapy. *PLOS ONE*, 7:e45127.
- Kabelitz, D., Marischen, L., Oberg, H.-H., Holtmeier, W., and Wesch, D. (2005). Epithelial defence by  $\gamma\delta$  T cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137(1):73–81.
- Kalyan, S. and Kabelitz, D. (2013). Defining the nature of human  $\gamma\delta$  T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cellular & Molecular Immunology*, 10:21–29.
- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquère, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., and Busson, P. (2006). Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer*, 6:283.
- Kim, K., Mayer, E. P., and Nachtigal, M. (2003). Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1641:13–23.
- Kim, M. K., Sung, C. O., Do, I.-G., Jeon, H.-K., Song, T. J., Park, H. S., Lee, Y.-Y., Kim, B.-G., Lee, J.-W., and Bae, D.-S. (2011). Overexpression of galectin-3 and its clinical significance in ovarian carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*, 16:352–358.
- Klas, C., Debatin, K. M., Jonker, R. R., and Krammer, P. H. (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *International Immunology*, 5:625–630.
- Kobayashi, H., Tanaka, Y., Yagi, J., Minato, N., and Tanabe, K. (2011a). Phase I/II study of adoptive transfer of  $\gamma\delta$  T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 60:1075–84.

## Literaturverzeichnis

- Kobayashi, H., Tanaka, Y., Yagi, J., Osaka, Y., Nakazawa, H., Uchiyama, T., Minato, N., and Toma, H. (2007). 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*, 56:469–76.
- Kobayashi, T., Shimura, T., Yajima, T., Kubo, N., Araki, K., Tsutsumi, S., Suzuki, H., Kuwano, H., and Raz, A. (2011b). Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of  $\beta$ -catenin. *International Journal of Cancer*, 129:2775–2786.
- Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Somerville, R. P. T., Carpenter, R. O., Stetler-Stevenson, M., Yang, J. C., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., Raffeld, M., Feldman, S., Lu, L., Li, Y. F., Ngo, L. T., Goy, A., Feldman, T., Spaner, D. E., Wang, M. L., Chen, C. C., Kranick, S. M., Nath, A., Nathan, D.-A. N., Morton, K. E., Toomey, M. A., and Rosenberg, S. A. (2015). Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33:540–9.
- Koopmann, J., Buckhaults, P., Brown, D. A., Zahurak, M. L., Sato, N., Fukushima, N., Sokoll, L. J., Chan, D. W., Yeo, C. J., Hruban, R. H., Breit, S. N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Goggins, M. (2006). Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10:2386–2392.
- Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A. B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., and Jaffee, E. (2015). Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8+ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research*, 3:412–423.
- Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V., and von Mollard, G. F. (2002). The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *European Journal of Cell Biology*, 81:273–280.
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G., and Coligan, J. E. (2013). LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*, 121:4672–83.

- Kunzmann, V., Smetak, M., Kimmel, B., Weigang-Koehler, K., Goebeler, M., Birkmann, J., Becker, J., Schmidt-Wolf, I. G. H., Einsele, H., and Wilhelm, M. (2012). Tumor-promoting versus tumor-antagonizing roles of  $\gamma\delta$  T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 35:205–13.
- Laird, R. M. and Hayes, S. M. (2010). Roles of the Src tyrosine kinases Lck and Fyn in regulating gammadelta TCR signal strength. *PLOS ONE*, 5:e8899.
- Laitinen, O. H., Hytönen, V. P., Nordlund, H. R., and Kulomaa, M. S. (2006). Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63:2992–3017.
- Landmeier, S., Altvater, B., Pscherer, S., Juergens, H., Varnholt, L., Hansmeier, A., Bollard, C. M., Moosmann, A., Bisping, G., and Rossig, C. (2009). Activated human gammadelta T cells as stimulators of specific CD8+ T-cell responses to subdominant epstein barr virus epitopes: potential for immunotherapy of cancer. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 32:310–21.
- Laoui, D., Van Overmeire, E., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J. A., and Raes, G. (2014). Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. *Frontiers in Immunology*, 5:489.
- Leitner, J., Kuschei, W., Grabmeier-Pfistershammer, K., Woitek, R., Kriehuber, E., Majdic, O., Zlabinger, G., Pickl, W. F., and Steinberger, P. (2010). T cell stimulator cells, an efficient and versatile cellular system to assess the role of costimulatory ligands in the activation of human T cells. *Journal of Immunological Methods*, 362:131–41.
- Leitner, J., Rieger, A., Pickl, W. F., Zlabinger, G., Grabmeier-Pfistershammer, K., and Steinberger, P. (2013). TIM-3 does not act as a receptor for galectin-9. *PLOS Pathogens*, 9:e1003253.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S. H., Mostov, K. E., and Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:11750–11757.
- Liu, C. and Hermann, T. E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *The Journal of Biological Chemistry*, 253:5892–5894.

## Literaturverzeichnis

- Liu, F. T., Hsu, D. K., Zuberi, R. I., Kuwabara, I., Chi, E. Y., and Henderson, W. R. (1995). Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *The American Journal of Pathology*, 147:1016–1028.
- Liu, Z., Guo, B., and Lopez, R. D. (2009). Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytotoxicity by human gamma delta-T cells: implications in the design of gamma delta-T-cell-based immunotherapies for pancreatic cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24:900–911.
- Loibl, S. and Gianni, L. (2017). HER2-positive breast cancer. *Lancet (London, England)*, 389:2415–2429.
- Lu, H., Liu, Y., Wang, D., Wang, L., Zhou, H., Xu, G., Xie, L., Wu, M., Lin, Z., Yu, Y., and Li, G. (2016). Galectin-3 regulates metastatic capabilities and chemotherapy sensitivity in epithelial ovarian carcinoma via NF- $\kappa$ B pathway. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37:11469–11477.
- Lunardi, S., Muschel, R. J., and Brunner, T. B. (2014). The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Letters*, 343:147–55.
- Luo, Z., Wang, Q., Lau, W. B., Lau, B., Xu, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, M., Xuan, Y., Yang, Y., Lei, L., Wang, C., Yi, T., Zhao, X., Wei, Y., and Zhou, S. (2016). Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? *Cancer Letters*, 377:174–82.
- Luoma, A. M., Castro, C. D., Mayassi, T., Bembinster, L. A., Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Scharf, L., Kung, J. E., Sibener, L. V., Savage, P. B., Jabri, B., Bendelac, A., and Adams, E. J. (2013). Crystal structure of V $\delta$ 1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity*, 39:1032–1042.
- Lykken, J. M., Horikawa, M., Minard-Colin, V., Kamata, M., Miyagaki, T., Poe, J. C., and Tedder, T. F. (2016). Galectin-1 drives lymphoma CD20 immunotherapy resistance: validation of a preclinical system to identify resistance mechanisms. *Blood*, 127:1886–1895.
- MacKinnon, A. C., Farnworth, S. L., Hodgkinson, P. S., Henderson, N. C., Atkinson, K. M., Leffler, H., Nilsson, U. J., Haslett, C., Forbes, S. J., and Sethi, T. (2008). Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180:2650–2658.

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25:677–686.
- Marcucci, F., Rumio, C., and Corti, A. (2017). Tumor cell-associated immune checkpoint molecules - drivers of malignancy and stemness. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1868:571–583.
- Margadant, C., van den Bout, I., van Boxtel, A. L., Thijssen, V. L., and Sonnenberg, A. (2012). Epigenetic regulation of galectin-3 expression by  $\beta 1$  integrins promotes cell adhesion and migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 287:44684–44693.
- Märten, A., von Lilienfeld-Toal, M., Büchler, M. W., and Schmidt, J. (2006). Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity. *International Journal of Cancer*, 119:2359–2365.
- Martinet, L., Fleury-Cappellesso, S., Gadelorge, M., Dietrich, G., Bourin, P., Fournié, J.-J., and Poupot, R. (2009). A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*, 39:752–762.
- Martinet, L., Jean, C., Dietrich, G., Fournié, J.-J., and Poupot, R. (2010). PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. *Biochemical Pharmacology*, 80:838–845.
- Matarrese, P., Fusco, O., Tinari, N., Natoli, C., Liu, F. T., Semeraro, M. L., Malorni, W., and Iacobelli, S. (2000). Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *International Journal of Cancer*, 85:545–554.
- Mathew, E., Brannon, A. L., Del Vecchio, A., Garcia, P. E., Penny, M. K., Kane, K. T., Vinta, A., Buckanovich, R. J., and di Magliano, M. P. (2016). Mesenchymal stem cells promote pancreatic tumor growth by inducing alternative polarization of macrophages. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 18:142–151.
- Maybruck, B. T., Pfannenstiel, L. W., Diaz-Montero, M., and Gastman, B. R. (2017). Tumor-derived exosomes induce CD8<sup>+</sup> T cell suppressors. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 5:65.
- Medema, J. P., Toes, R. E., Scaffidi, C., Zheng, T. S., Flavell, R. A., Melief, C. J., Peter, M. E., Offringa, R., and Krammer, P. H. (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme

## Literaturverzeichnis

- B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *European Journal of Immunology*, 27:3492–8.
- Melief, S. M., Visser, M., van der Burg, S. H., and Verdegaal, E. M. E. (2017). IDO and galectin-3 hamper the ex vivo generation of clinical grade tumor-specific T cells for adoptive cell therapy in metastatic melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 66:913–926.
- Méndez-Huergo, S. P., Blidner, A. G., and Rabinovich, G. A. (2017). Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Current Opinion in Immunology*, 45:8–15.
- Menon, R. P., Strom, M., and Hughes, R. C. (2000). Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with galectin-3 in a carbohydrate-independent manner. *FEBS Letters*, 470:227–231.
- Meuter, S., Eberl, M., and Moser, B. (2010). Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human gammadelta T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:8730–5.
- Mingari, M. C., Varese, P., Bottino, C., Melioli, G., Moretta, A., and Moretta, L. (1988). Clonal analysis of CD4-CD8- human thymocytes expressing a T cell receptor gamma/delta chain. direct evidence for the de novo expression of CD8 surface antigen and of cytolytic activity against tumor targets. *European Journal of Immunology*, 18:1831–1834.
- Moore, M. W., Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 54:777–785.
- Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B. R., Golan, D. E., and Brenner, M. B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*, 3:495–507.
- Morris, J. P., Wang, S. C., and Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews. Cancer*, 10:683–695.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie, 7. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Murtaugh, L. C. (2014). Pathogenesis of pancreatic cancer: lessons from animal models. *Toxicologic Pathology*, 42:217–228.



- Nangia-Makker, P., Raz, T., Tait, L., Hogan, V., Fridman, R., and Raz, A. (2007). Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer Research*, 67:11760–11768.
- Nicol, A. J., Tokuyama, H., Mattarollo, S. R., Hagi, T., Suzuki, K., Yokokawa, K., and Nieda, M. (2011). Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer*, 105:778–86.
- Oberg, H.-H., Grage-Griebenow, E., Adam-Klages, S., Jerg, E., Peipp, M., Kellner, C., Petrick, D., Gonnermann, D., Freitag-Wolf, S., Röcken, C., Sebens, T., Vogel, I., Becker, T., Ebsen, M., Kabelitz, D., Wesch, D., and Sebens, S. (2016). Monitoring and functional characterization of the lymphocytic compartment in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP)*, 16:1069–1079.
- Oberg, H.-H., Kellner, C., Gonnermann, D., Peipp, M., Peters, C., Sebens, S., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2015).  $\gamma\delta$  T cell activation by bispecific antibodies. *Cellular Immunology*, 296:41–49.
- Oberg, H.-H., Peipp, M., Kellner, C., Sebens, S., Krause, S., Petrick, D., Adam-Klages, S., Röcken, C., Becker, T., Vogel, I., Weisner, D., Freitag-Wolf, S., Gramatzki, M., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2014). Novel bispecific antibodies increase  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 74:1349–1360.
- Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D. E., Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G., and Raz, A. (1994). Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry*, 33:14109–14114.
- Ochieng, J., Green, B., Evans, S., James, O., and Warfield, P. (1998a). Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379:97–106.
- Ochieng, J., Leite-Browning, M. L., and Warfield, P. (1998b). Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246:788–791.
- Offenhäuser, C., Lei, N., Roy, S., Collins, B. M., Stow, J. L., and Murray, R. Z. (2011). Syntaxin 11 binds Vti1b and regulates late endosome to lysosome fusion in macrophages. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12:762–773.

## Literaturverzeichnis

- Oka, N., Nakahara, S., Takenaka, Y., Fukumori, T., Hogan, V., Kanayama, H.-O., Yanagawa, T., and Raz, A. (2005). Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Research*, 65:7546–53.
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121:335–348.
- Patel, T. A., Dave, B., Rodriguez, A. A., Chang, J. C., Perez, E. A., and Colon-Otero, G. (2014). Dual HER2 blockade: preclinical and clinical data. *Breast Cancer Research: BCR*, 16:419.
- Patterson, R. J., Wang, W., and Wang, J. L. (2002). Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconjugate Journal*, 19:499–506.
- Pechhold, K., Pohl, T., and Kabelitz, D. (1994a). Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. *Cytometry*, 16:152–159.
- Pechhold, K., Wesch, D., Schondelmaier, S., and Kabelitz, D. (1994b). 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)*, 152:4984–4992.
- Peipp, M., Wesch, D., Oberg, H.-H., Lutz, S., Muskulus, A., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I., Burger, R., Humpe, A., Kabelitz, D., Gramatzki, M., and Kellner, C. (2017). CD20-specific immunoligands engaging NKG2D enhance  $\gamma\delta$  T cell-mediated lysis of lymphoma cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 86:196–206.
- Peng, W., Wang, H. Y., Miyahara, Y., Peng, G., and Wang, R.-F. (2008). Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Research*, 68:7228–7236.
- Perren, T. J., Swart, A. M., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M. S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., du Bois, A., Sehouli, J., Kimmig, R., Stähle, A., Collinson, F., Essapen, S., Gourley, C., Lortholary, A., Selle, F., Mirza, M. R., Leminen, A., Plante, M., Stark, D., Qian, W., Parmar, M. K. B., Oza, A. M., and Investigators, I. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 365:2484–2496.

- Peters, C., Häslner, R., Wesch, D., and Kabelitz, D. (2016). Human V $\delta$ 2 T cells are a major source of interleukin-9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113:12520–12525.
- Peters, C., Oberg, H.-H., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2014). Phenotype and regulation of immunosuppressive V $\delta$ 2-expressing  $\gamma\delta$  T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(10):1943.
- Petit, A.-E., Demotte, N., Scheid, B., Wildmann, C., Bigirimana, R., Gordon-Alonso, M., Carasco, J., Valitutti, S., Godelaine, D., and van der Bruggen, P. (2016). A major secretory defect of tumour-infiltrating T lymphocytes due to galectin impairing LFA-1-mediated synapse completion. *Nature Communications*, 7:12242.
- Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167:1137–1140.
- Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Heibein, J. A., Wolf, B. B., Kuwana, T., Goldstein, J. C., Newmeyer, D. D., Bleackley, R. C., and Green, D. R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:12060–7.
- Poupot, M., Pont, F., and Fournié, J.-J. (2005). Profiling blood lymphocyte interactions with cancer cells uncovers the innate reactivity of human gamma delta T cells to anaplastic large cell lymphoma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174:1717–22.
- Puan, K.-J., Jin, C., Wang, H., Sarikonda, G., Raker, A. M., Lee, H. K., Samuelson, M. I., Märker-Hermann, E., Pasa-Tolic, L., Nieves, E., Giner, J.-L., Kuzuyama, T., and Morita, C. T. (2007). Preferential recognition of a microbial metabolite by human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells. *International Immunology*, 19:657–673.
- Radosavljevic, G., Volarevic, V., Jovanovic, I., Milovanovic, M., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Hsu, D. K., and Lukic, M. L. (2012). The roles of galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunologic Research*, 52:100–110.
- Rao, S. P., Wang, Z., Zuberi, R. I., Sikora, L., Bahaie, N. S., Zuraw, B. L., Liu, F.-T., and Sriramarao, P. (2007). Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179:7800–7807.

## Literaturverzeichnis

- Read, S., Malmström, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2):295–302.
- Rhodes, D. A., Chen, H.-C., Price, A. J., Keeble, A. H., Davey, M. S., James, L. C., Eberl, M., and Trowsdale, J. (2015). Activation of human  $\gamma\delta$  T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194:2390–2398.
- Riaño, F., Karunakaran, M. M., Starick, L., Li, J., Scholz, C. J., Kunzmann, V., Olive, D., Amslinger, S., and Herrmann, T. (2014). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6. *European Journal of Immunology*, 44:2571–2576.
- Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., Wrobel, P., Kabelitz, D., Steinle, A., and Herrmann, T. (2005). Activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by NKG2D. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175:2144–2151.
- Roark, C. L., Simonian, P. L., Fontenot, A. P., Born, W. K., and O'Brien, R. L. (2008).  $\gamma\delta$  T cells: an important source of IL-17. *Current Opinion in Immunology*, 20(3):353–357.
- Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Auflage.*
- Roelofs, A. J., Jauhainen, M., Mönkkönen, H., Rogers, M. J., Mönkkönen, J., and Thompson, K. (2009). Peripheral blood monocytes are responsible for  $\gamma\delta$  T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *British Journal of Haematology*, 144:245–250.
- Salim, M., Knowles, T. J., Baker, A. T., Davey, M. S., Jeeves, M., Sridhar, P., Wilkie, J., Willcox, C. R., Kadri, H., Taher, T. E., Vantourout, P., Hayday, A., Mehellou, Y., Mohammed, F., and Willcox, B. E. (2017). BTN3A1 discriminates gammadelta T cell phosphoantigens from nonantigenic small molecules *via* a conformational sensor in its B30.2 domain. *ACS Chemical Biology*, 12:2631–2643.
- Sandstrom, A., Peigné, C.-M., Léger, A., Crooks, J. E., Konczak, F., Gesnel, M.-C., Brethnach, R., Bonneville, M., Scotet, E., and Adams, E. J. (2014). The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Immunity*, 40:490–500.

- Sano, H., Hsu, D. K., Apgar, J. R., Yu, L., Sharma, B. B., Kuwabara, I., Izui, S., and Liu, F.-T. (2003). Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 112:389–397.
- Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., and Liu, F. T. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165:2156–2164.
- Saravanan, C., Liu, F.-T., Gipson, I. K., and Panjwani, N. (2009). Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *Journal of Cell Science*, 122:3684–3693.
- Sato, M., Nishi, N., Shoji, H., Seki, M., Hashidate, T., Hirabayashi, J., Kasai Ki, K.-i., Hata, Y., Suzuki, S., Hirashima, M., and Nakamura, T. (2002a). Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology*, 12:191–197.
- Sato, S., Burdett, I., and Hughes, R. C. (1993a). Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Experimental Cell Research*, 207:8–18.
- Sato, S., Ouellet, N., Pelletier, I., Simard, M., Rancourt, A., and Bergeron, M. G. (2002b). Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168:1813–1822.
- Sato, T., Furukawa, K., Autero, M., Gahmberg, C. G., and Kobata, A. (1993b). Structural study of the sugar chains of human leukocyte common antigen CD45. *Biochemistry*, 32:12694–12704.
- Saunders, A. E. and Johnson, P. (2010). Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cellular Signalling*, 22:339–348.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banche-reau, J., and Ueno, H. (2014). The cytokine TGF- $\beta$  co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nature Immunology*.
- Schondelmaier, S., Wesch, D., Pechhold, K., and Kabelitz, D. (1993). V $\gamma$  gene usage in peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells. *Immunology Letters*, 38(2):121–126.

## Literaturverzeichnis

- Schulz, H., Schmoeckel, E., Kuhn, C., Hofmann, S., Mayr, D., Mahner, S., and Jeschke, U. (2017). Galectins-1, -3, and -7 are prognostic markers for survival of ovarian cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 18.
- Serrano-Olvera, A., Dueñas González, A., Gallardo-Rincón, D., Candelaria, M., and De la Garza-Salazar, J. (2006). Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 32:180–190.
- Shalom-Feuerstein, R., Cooks, T., Raz, A., and Kloog, Y. (2005). Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Research*, 65:7292–300.
- Shekhar, M. P. V., Nangia-Makker, P., Tait, L., Miller, F., and Raz, A. (2004). Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. *The American Journal of Pathology*, 165:1931–1941.
- Shen, B., Zheng, M.-Q., Lu, J.-W., Jiang, Q., Wang, T.-H., and Huang, X.-E. (2013). CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14:5403–5408.
- Shimamura, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Shimada, K., Kosuge, T., Sato, Y., Tanaka, K., Sekihara, H., and Hirohashi, S. (2002). Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8:2570–2575.
- Shojaei, H., Oberg, H.-H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2009). Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human  $\gamma\delta$  T cells. *Cancer Research*, 69:8710–8717.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67:7–30.
- Silva-Monteiro, E., Reis Lorenzato, L., Kenji Nihei, O., Junqueira, M., Rabinovich, G. A., Hsu, D. K., Liu, F.-T., Savino, W., Chammas, R., and Villa-Verde, D. M. S. (2007). Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Pathology*, 170:546–556.

- Simeone, D. M., Ji, B., Banerjee, M., Arumugam, T., Li, D., Anderson, M. A., Bamberger, A. M., Greenson, J., Brand, R. E., Ramachandran, V., and Logsdon, C. D. (2007). CEA-CAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas*, 34:436–443.
- Singh, J. C., Jhaveri, K., and Esteva, F. J. (2014). HER2-positive advanced breast cancer: optimizing patient outcomes and opportunities for drug development. *British Journal of Cancer*, 111:1888–98.
- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., and Klöppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 442:444–452.
- Sleightholm, R. L., Neilsen, B. K., Li, J., Steele, M. M., Singh, R. K., Hollingsworth, M. A., and Oupicky, D. (2017). Emerging roles of the cxcl12/cxcr4 axis in pancreatic cancer progression and therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 179:158–170.
- Song, S., Ji, B., Ramachandran, V., Wang, H., Hafley, M., Logsdon, C., and Bresalier, R. S. (2012). Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLOS ONE*, 7:e42699.
- Spitzenberger, F., Graessler, J., and Schroeder, H. E. (2001). Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues. *Biochimie*, 83:851–862.
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., Dehzad, N., Becker, M., Stassen, M., Steinborn, A., Lohoff, M., Schild, H., Schmitt, E., and Bopp, T. (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, 33:192–202.
- Stillman, B. N., Hsu, D. K., Pang, M., Brewer, C. F., Johnson, P., Liu, F.-T., and Baum, L. G. (2006). Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176:778–789.
- Stubenrauch, K., Wessels, U., Essig, U., Kowalewsky, F., Vogel, R., and Heinrich, J. (2013). Characterization of murine anti-human Fab antibodies for use in an immunoassay for generic quantification of human Fab fragments in non-human serum samples including cynomolgus monkey samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72:208–215.

## Literaturverzeichnis

- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A., and Trapani, J. A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192:1403–14.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100:655–669.
- Szebeni, G. J., Vizler, C., Kitajka, K., and Puskas, L. G. (2017). Inflammation and cancer: Extra- and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters. *Mediators of Inflammation*, 2017:9294018.
- Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.-W., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 125:4049–4057.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2):303–310.
- Takayama, R., Nakagawa, H., Sawaki, A., Mizuno, N., Kawai, H., Tajika, M., Yatabe, Y., Matsuo, K., Uehara, R., Ono, K.-i., Nakamura, Y., and Yamao, K. (2010). Serum tumor antigen REG4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 45:52–59.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7:94–100.
- Takeichi, T., Mocevicius, P., Deduchovas, O., Salnikova, O., Castro-Santa, E., Büchler, M. W., Schmidt, J., and Ryschich, E. (2012).  $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin is indispensable for CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment in experimental pancreatic and hepatocellular cancer. *International Journal of Cancer*, 130:2067–2076.
- Takenaka, Y., Fukumori, T., and Raz, A. (2002). Galectin-3 and metastasis. *Glycoconjugate Journal*, 19:543–549.



- Tanaka, Y., Morita, C. T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M. B., and Bloom, B. R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*, 375:155–158.
- Tang, Q. and Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, 9:239–244.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166:7309–7318.
- Thijssen, V. L., Heusschen, R., Caers, J., and Griffioen, A. W. (2015). Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1855:235–247.
- Togayachi, A., Kozono, Y., Ishida, H., Abe, S., Suzuki, N., Tsunoda, Y., Hagiwara, K., Kuno, A., Ohkura, T., Sato, N., Sato, T., Hirabayashi, J., Ikehara, Y., Tachibana, K., and Narimatsu, H. (2007). Poly lactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:15829–15834.
- Traber, P. G., Chou, H., Zomer, E., Hong, F., Klyosov, A., Fiel, M.-I., and Friedman, S. L. (2013). Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. *PLOS ONE*, 8:e75361.
- Truong, M. J., Gruart, V., Kusnierz, J. P., Papin, J. P., Loiseau, S., Capron, A., and Capron, M. (1993a). Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 177:243–248.
- Truong, M. J., Gruart, V., Liu, F. T., Prin, L., Capron, A., and Capron, M. (1993b). IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 23:3230–3235.
- Tsuboi, S., Sutoh, M., Hatakeyama, S., Hiraoka, N., Habuchi, T., Horikawa, Y., Hashimoto, Y., Yoneyama, T., Mori, K., Koie, T., Nakamura, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Fukuda, M., and Ohyama, C. (2011). A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *The EMBO Journal*, 30:3173–3185.

## Literaturverzeichnis

- Uccelli, A. and de Rosbo, N. K. (2015). The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: mode of action and pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351:114–126.
- Vantourout, P., Laing, A., Woodward, M. J., Zlatareva, I., Apolonia, L., Jones, A. W., Snijders, A. P., Malim, M. H., and Hayday, A. C. (2018). Heteromeric interactions regulate butyrophilin (BTN) and BTN-like molecules governing gammadelta T cell biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115:1039–1044.
- Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G. S., Ramanjaneyulu, G. S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N. K., Gostick, E., Price, D. A., Soudamini, D. U., Voon, K. K., Olivo, M., Rossjohn, J., Mori, L., and De Libero, G. (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human  $\gamma\delta$  T cells. *Nature Immunology*, 14:908–916.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- $\beta$  'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology*, 9:1341–1346.
- Vyakarnam, A., Dagher, S. F., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (1997). Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Molecular and Cellular Biology*, 17:4730–4737.
- Wang, H. and Morita, C. T. (2015). Sensor function for butyrophilin 3A1 in prenyl pyrophosphate stimulation of human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195:4583–4594.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, S., Cai, J., Shi, J., Sui, X., Cao, Y., Huang, W., Chen, X., Cai, Z., Li, H., Bardeesi, A. S. A., Zhang, B., Liu, M., Song, W., Wang, M., and Xiang, A. P. (2015). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget*, 6:42825–42837.
- Wang, L., Friess, H., Zhu, Z., Frigeri, L., Zimmermann, A., Korc, M., Berberat, P. O., and Büchler, M. W. (2000). Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Laboratory Investigation: A Journal of Technical Methods and Pathology*, 80:1233–1241.
- Wang, W., Guo, H., Geng, J., Zheng, X., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2014). Tumor-released galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *The Journal of Biological Chemistry*, 289:33311–33319.

- Wang, Y., Nangia-Makker, P., Tait, L., Balan, V., Hogan, V., Pienta, K. J., and Raz, A. (2009). Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *The American Journal of Pathology*, 174:1515–1523.
- Welton, J. L., Khanna, S., Giles, P. J., Brennan, P., Brewis, I. A., Staffurth, J., Mason, M. D., and Clayton, A. (2010). Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9:1324–1338.
- Wesch, D., Glatzel, A., and Kabelitz, D. (2001). Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cellular Immunology*, 212:110–117.
- Wesch, D., Hinz, T., and Kabelitz, D. (1998). Analysis of the TCR V $\gamma$  repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals. *International Immunology*, 10:1067–75.
- Wesch, D., Marx, S., and Kabelitz, D. (1997). Comparative analysis of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell activation by mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *European Journal of Immunology*, 27:952–6.
- Wesch, D., Peters, C., and Siegers, G. M. (2014). Human  $\gamma\delta$  T regulatory cells in cancer: fact or fiction? *Frontiers in Immunology*, 5:598.
- Westphalen, C. B. and Olive, K. P. (2012). Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18:502–10.
- Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.-C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., and de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology*, 8:950–7.
- Wilson, T. J., Firth, M. N., Powell, J. T., and Harrison, F. L. (1989). The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *The Biochemical Journal*, 261:847–852.
- Wrobel, P., Shojaei, H., Schitteck, B., Gieseler, F., Wollenberg, B., Kalthoff, H., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2007). Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66:320–328.

## Literaturverzeichnis

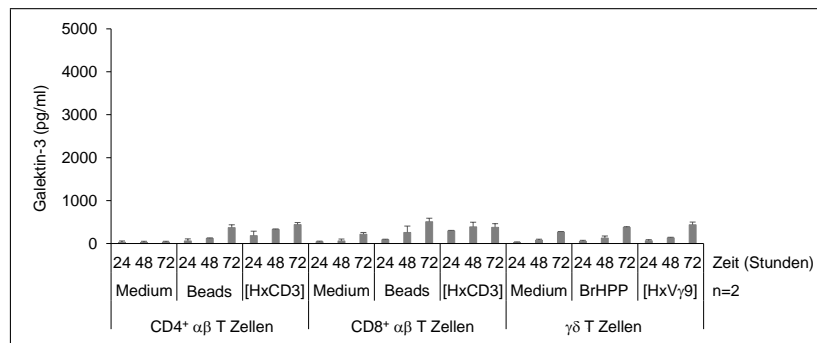
- Wu, F., Hu, N., Li, Y., Bian, B., Xu, G., and Zheng, Y. (2012). Galectin-3 genetic variants are associated with platinum-based chemotherapy response and prognosis in patients with NSCLC. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 35:175–180.
- Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., Chen, Z., Wang, K., Zhang, T., Xu, J., Han, Y., Zhang, T., Wu, X., Wang, J., Gong, W., Zheng, S., Qiu, F., Yan, J., and Huang, J. (2014).  $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, 40:785–800.
- Wu, Y., Wu, W., Wong, W. M., Ward, E., Thrasher, A. J., Goldblatt, D., Osman, M., Digard, P., Canaday, D. H., and Gustafsson, K. (2009). Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183:5622–9.
- Xie, L., Ni, W.-K., Chen, X.-D., Xiao, M.-B., Chen, B.-Y., He, S., Lu, C.-H., Li, X.-Y., Jiang, F., and Ni, R.-Z. (2012). The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138:1035–1043.
- Xu, B., Pizarro, J. C., Holmes, M. A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R. K. (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:2414–2419.
- Xue, H., Liu, L., Zhao, Z., Zhang, Z., Guan, Y., Cheng, H., Zhou, Y., and Tai, G. (2017). The N-terminal tail coordinates with carbohydrate recognition domain to mediate galectin-3 induced apoptosis in T cells. *Oncotarget*, 8:49824–49838.
- Yang, R. Y., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:6737–6742.
- Yiannakou, J. Y., Newland, P., Calder, F., Kingsnorth, A. N., and Rhodes, J. M. (1997). Prospective study of CAM 17.1/WGA mucin assay for serological diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*, 349:389–392.
- Zheng, W. and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89:587–596.

- Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Kuchroo, V. K. (2005). The TIM-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*, 6:1245–1252.
- Zuberi, R. I., Hsu, D. K., Kalayci, O., Chen, H.-Y., Sheldon, H. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kawakami, T., Lilly, C. M., and Liu, F.-T. (2004). Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *The American Journal of Pathology*, 165:2045–2053.
- Zubieta, M. R., Furman, D., Barrio, M., Bravo, A. I., Domenichini, E., and Mordoh, J. (2006). Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *The American Journal of Pathology*, 168:1666–1675.
- Zumerle, S., Molon, B., and Viola, A. (2017). Membrane rafts in T cell activation: A spotlight on CD28 costimulation. *Frontiers in Immunology*, 8:1467.

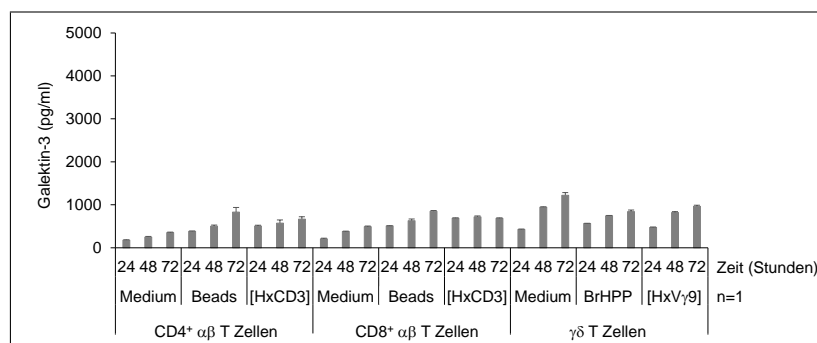


# 6 Anhang

## 6.1 Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von weiteren PDAC Zellen mit frisch isolierten T Zellen

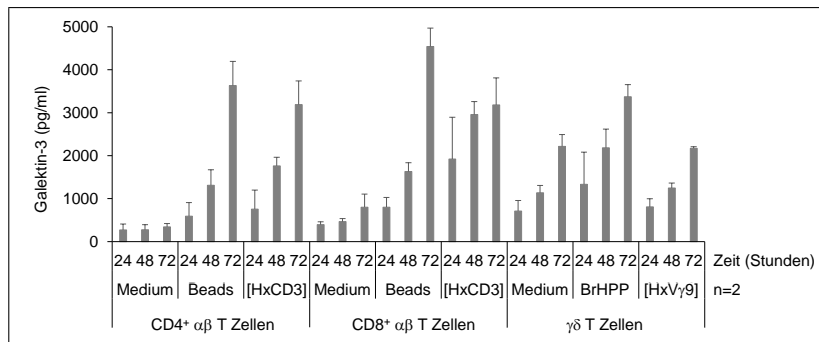


**Abbildung 6.1: Wenig Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Panc89 Zellen.** 200.000 CD4<sup>+</sup>αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup>αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden durch magnetische Separation isoliert und mit bispezifischem Antikörper ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]) oder Beads (αβ T Zellen) bzw. Phosphoantigen BrHPP (γδ T Zellen) und 50 IU IL-2 in Anwesenheit von Panc89 Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) stimuliert. Nach 24, 48 oder 72 Stunden wurden Zellkulturüberstände genommen und mittels ELISA auf Galektin-3 überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei Spendern.



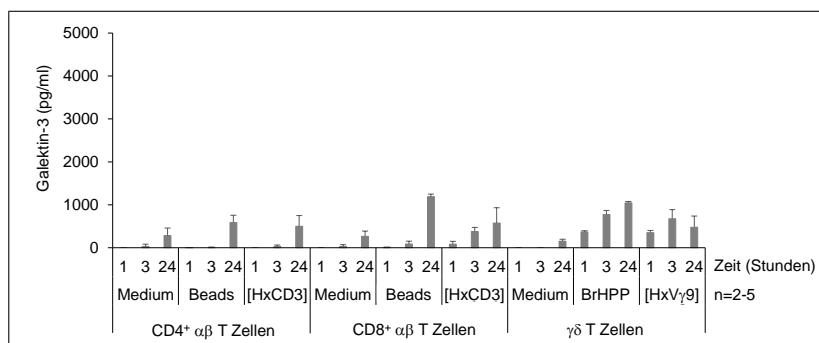
**Abbildung 6.2: Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Colo357 Zellen.** 200.000 magnetisch isolierte CD4<sup>+</sup>αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup>αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden in Gegenwart von Colo357 Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) und 50 IU IL-2 mit den angegebenen Stimuli stimuliert ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]). Die Galektin-3 Menge im Überstand wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von einem Spender.

## 6 Anhang



**Abbildung 6.3: Starke Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Capan-1 Zellen.** 200.000 CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden mittels magnetischer Separation isoliert und in Gegenwart von 50IU IL-2 mit Capan-1 Zellen kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 20:1). 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit den angegebenen Stimuli wurden Überstände genommen und mit ELISA auf Galektin-3 überprüft. Die Balken stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei Spendern dar. [HxCD3]: [HER2xCD3], [HxVγ9]: [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9].

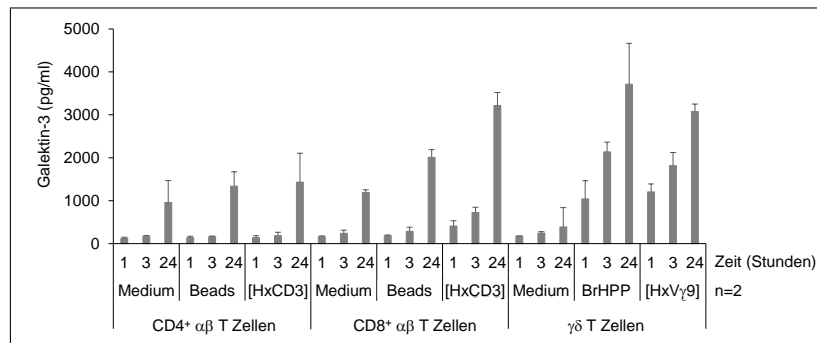
## 6.2 Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von weiteren PDAC Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien



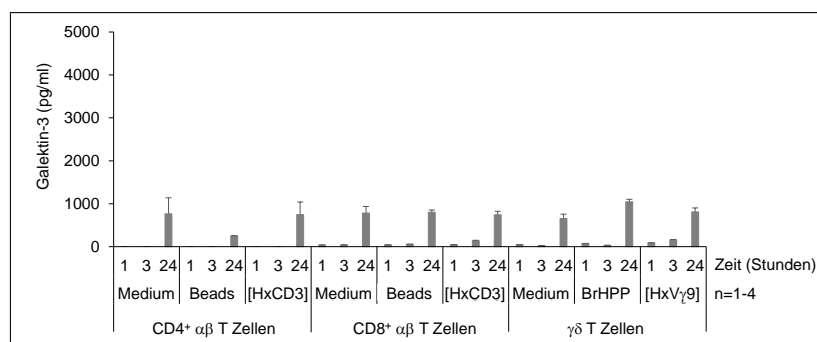
**Abbildung 6.4: Geringe Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von Panc89 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte T Zellen (CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen bzw. Vγ9Vδ2 γδ T Zellen) wurden mit Panc89 Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) kokultiviert und mit den angegebenen Stimuli und 12,5 IU IL-2 restimuliert ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]). Die in den Überstand freigesetzte Menge Galektin-3 wurde nach ein, drei und 24 Stunden mit ELISA bestimmt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei bis fünf Spendern.



## 6.2 Freisetzung von Galektin-3 in Kokultur von weiteren PDAC Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien

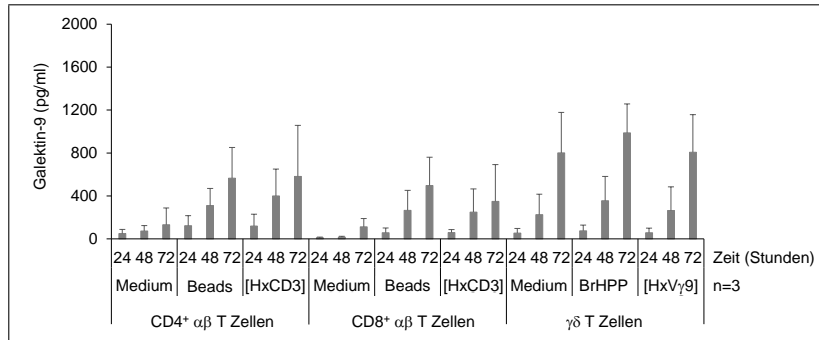


**Abbildung 6.5: Starke Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit Capan-1 Zellen.** 200.000 kurzzeit aktivierten T Zelllinien (CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen und CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen bzw. Vγ9Vδ2 γδ T Zellen) wurden in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 wie angegeben restimuliert und mit Capan-1 Zellen kokultiviert. Nach ein, drei und 24 Stunden wurden Zellkulturüberstände genommen und mit ELISA auf Galektin-3 überprüft. Die Balken stellen die Mittelwerte ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei Spendern dar. [HxCD3]: [HER2xCD3], [HxVγ9]: [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9].

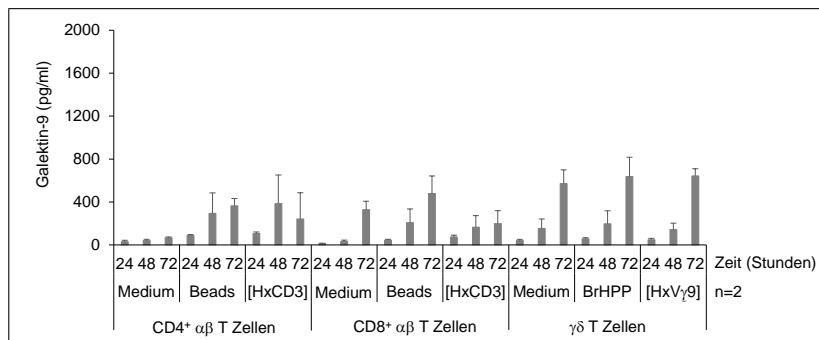


**Abbildung 6.6: Geringe Galektin-3 Freisetzung in Kokultur von kurzzeit aktivierten T Zelllinien mit Colo357 Zellen.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen oder kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zellen wurden mit Colo357 Zellen in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 kokultiviert und mit den angegebenen Stimuli restimuliert. Dargestellt ist die mittels ELISA bestimmte Galektin-3 Menge im Überstand nach ein, drei und 24 Stunden als Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von ein bis vier Spendern. [HxCD3]: [HER2xCD3], [HxVγ9]: [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9].

### 6.3 Freisetzung von Galekin-9 in Kokulturen von Tumorzellen mit frisch isolierten T Zellen

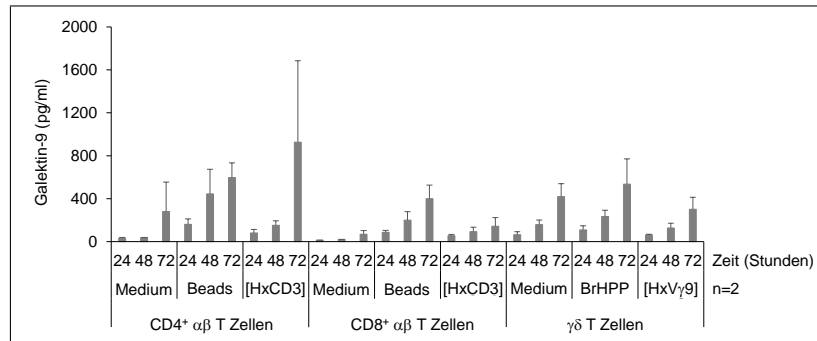


**Abbildung 6.7: Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit PancTu-I Zellen.** 200.000 CD4+ αβ T Zellen, CD8+ αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden durch magnetische Separation isoliert und mit PancTu-I Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) kokultiviert und in Gegenwart von 50 IU IL-2 unterschiedlich stimuliert ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]). Die Galektin-9 Menge im Zellkulturüberstand wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mit ELISA überprüft. Die Balken stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von drei Spendern dar.

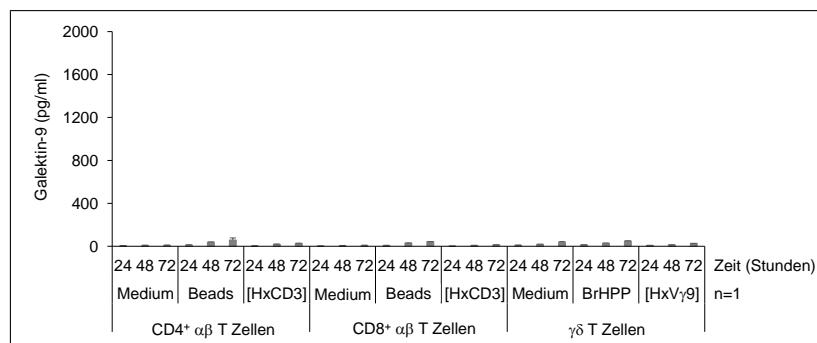


**Abbildung 6.8: Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Panc89 Zellen.** 200.000 magnetisch isolierte CD4+ αβ T Zellen, CD8+ αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden mit Panc89 Zellen kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) und in Gegenwart von 50 IU IL-2 mit den angegebenen Stimuli stimuliert ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]). Die Galektin-9 Menge im Überstand der Kokultur wurde durch ELISA nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei Spendern dar.

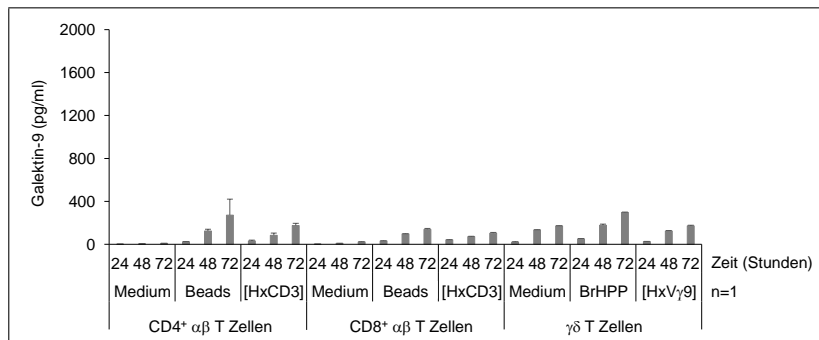
### 6.3 Freisetzung von Galekin-9 in Kokulturen von Tumorzellen mit frisch isolierten T Zellen



**Abbildung 6.9: Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Capan-1 Zellen.** Die Galektin-9 Menge im Überstand einer Kokultur aus 200.000 CD4<sup>+</sup>αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup>αβ T Zellen oder γδ T Zellen (magnetisch separiert) mit Capan-1 Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 20:1) wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung nach angegebener Stimulation (in Gegenwart von 50 IU IL-2) der T Zellen von zwei Spendern in Doppelwerten. [HxCD3]: [HER2xCD3], [HxVγ9]: [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9].

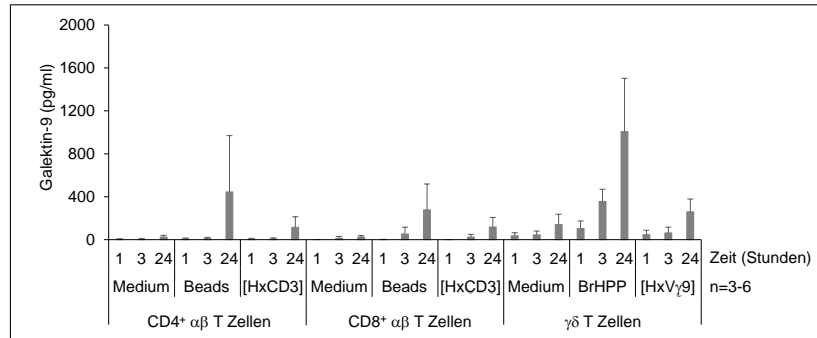


**Abbildung 6.10: Keine Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Panc1 Zellen.** In Kokultur von Panc1 Zellen mit 200.000 magnetisch separierten CD4<sup>+</sup>αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup>αβ T Zellen oder γδ T Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1), die in Gegenwart von 50 IU IL-2 mit den angegebenen Stimuli stimuliert wurden ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]), wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Überstände genommen und die Galektin-9 Menge mittels ELISA überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten eines Spenders.

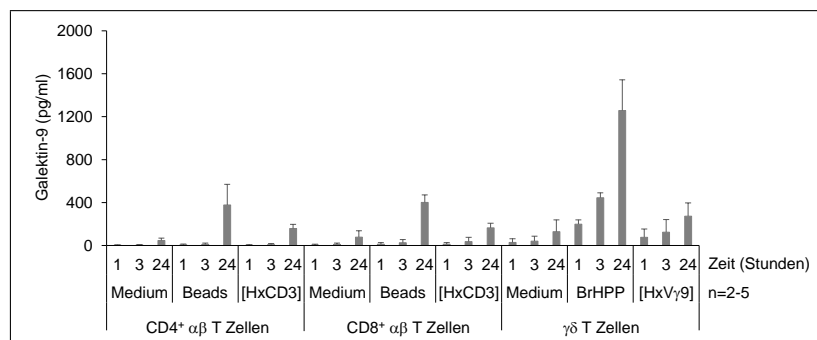


**Abbildung 6.11: Geringe Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von frisch isolierten T Zellen mit Colo357 Zellen.** 200.000 CD4<sup>+</sup> αβ T Zellen, CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen oder γδ T Zellen wurden magnetisch separiert und mit Colo357 Zellen kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1). 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation mit bispezifischem Antikörper ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]) oder Beads (αβ T Zellen) bzw. Phosphoantigen (γδ T Zellen) in Gegenwart von 50 IU IL-2 wurde die Galektin-9 Menge im Überstand durch ELISA bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten eines Spenders dar.

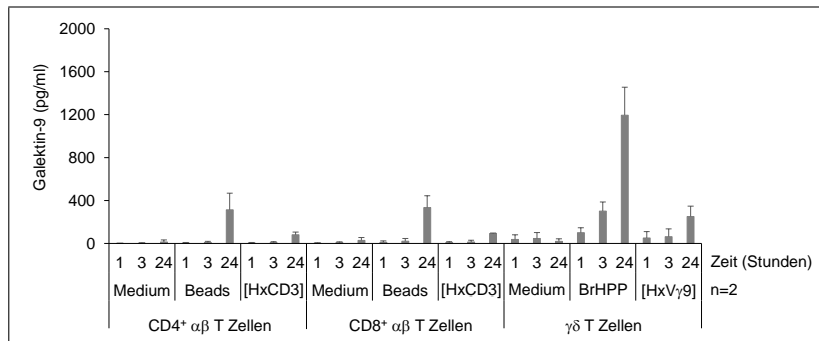
## 6.4 Freisetzung von Galekin-9 in Kokulturen von Tumorzellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien



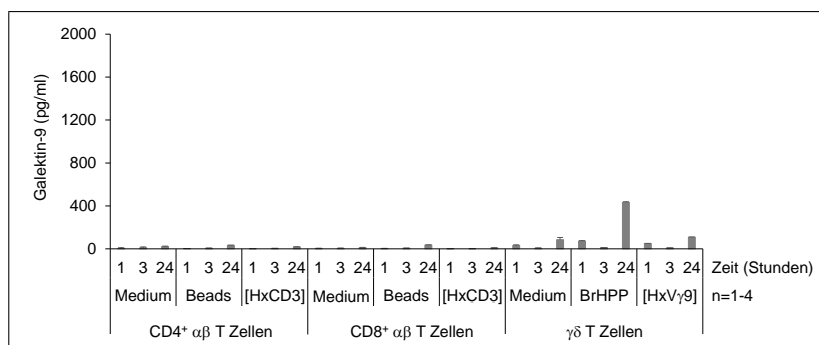
**Abbildung 6.12: Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von PancTu-I Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierten CD4<sup>+</sup>-, oder CD8<sup>+</sup> αβ T sowie kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zellen wurden mit PancTu-I Zellen (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) unter den angegebenen Restimulationsbedingungen in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 kokultiviert ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]). Die Menge an Galektin-9 im Kulturüberstand wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von drei bis sechs Spendern.



**Abbildung 6.13: Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von Panc89 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup>-, oder CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen sowie kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zellen wurden mit Panc89 Zellen kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1) und mit den angegebenen Stimuli und 12,5 IU IL-2 restimuliert ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]). Ein, drei und 24 Stunden nach Stimulation wurden Zellkulturüberstände genommen und mit ELISA auf Galektin-9 überprüft. Die Mittelwerte ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei bis fünf Spendern sind angegeben.

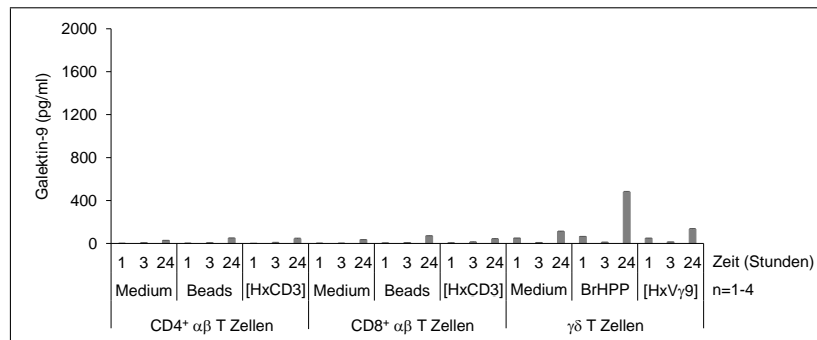


**Abbildung 6.14: Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von Capan-1 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup>-, oder CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen sowie kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zellen wurden in Gegenwart von 12,5 IU IL-2 mit Capan-1 Zellen kokultiviert (Effektor-Zielzell-Verhältnis 20:1) und mit bispezifischem Antikörper ([HxCD3] = [HER2xCD3], [HxVγ9] = [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9]) oder Beads bzw. Phosphoantigen restimuliert. Nach ein, drei und 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf Galektin-9 überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von zwei Spendern.



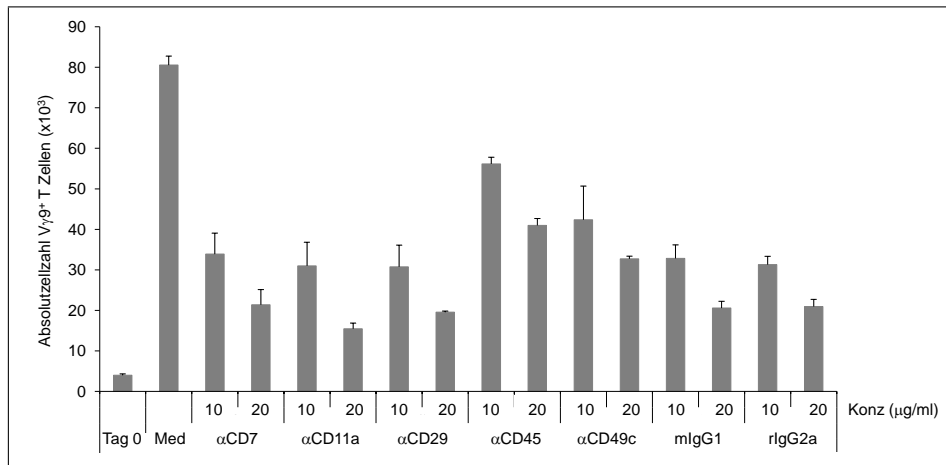
**Abbildung 6.15: Geringe Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von Panc1 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zellen oder CD4<sup>+</sup>-, sowie CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen wurden mit Panc1 Zellen Kokultiviert. Ein, drei und 24 Stunden nach anschließender Restimulation mit den angegebenen Stimuli und 12,5 IU IL-2 wurden Zellkulturüberstände entnommen und mit ELISA auf Galektin-9 überprüft. Der Mittelwert ± Standardabweichung von Doppelwerten von ein bis vier Spendern ist dargestellt. [HxCD3]: [HER2xCD3], [HxVγ9]: [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9].

## 6.4 Freisetzung von Galekin-9 in Kokulturen von Tumorzellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien



**Abbildung 6.16: Wenig Galektin-9 Freisetzung in Kokultur von Colo357 Zellen mit kurzzeit aktivierten T Zelllinien.** 200.000 kurzzeit aktivierte CD4<sup>+</sup>, oder CD8<sup>+</sup> αβ T Zellen bzw. kurzzeit aktivierte Vγ9Vδ2 γδ T Zellen wurden mit Colo357 Zellen kokultiviert und mit den angegebenen Stimuli und 12,5 IU IL-2 restimuliert. Nach ein, drei und 24 Stunden wurde die Galektin-9 Menge im Zellkulturüberstand mit ELISA gemessen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von ein bis vier Spendern. [HxCD3]: [HER2xCD3], [HxVγ9]: [(HER2)<sub>2</sub>xVγ9].

## 6.5 Neutralisierende Antikörper beeinflussen die $\gamma\delta$ T Zellproliferation



**Abbildung 6.17: Einfluss von neutralisierenden Antikörpern auf die  $\gamma\delta$  T Zellproliferation innerhalb der PBMZ.** 250.000 PBMZ wurden in 110  $\mu$ l in 96er Rundbodenplatten mit den angegebenen Antikörpern in Konzentrationen von 10  $\mu$ g/ml oder 20  $\mu$ g/ml vorinkubiert. Nach zwei Stunden wurden 50  $\mu$ l dieses Gemisches in eine 96er Flachbodenplatte überführt und mit 2,5  $\mu$ M Zoledronat in Gegenwart von 50 IU IL-2 stimuliert. Am Tag der Stimulation (Tag 0) und nach sechs Tagen wurde die Absolutzellzahl der V $\gamma$ 9-positiven  $\gamma\delta$  T Zellen mittels SCDA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Doppelwerten eines repräsentativen Spenders von zwei.



## 6.6 Lebenslauf

### Daniel Gonnermann

Friedrich-Ebert-Straße 70 • 04109 Leipzig

Geb. am. 08.07.1987 in Preetz/Plön  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Promotionsstudium

Seit 04/2014 **Institut für Immunologie**, AG Wesch/Kabelitz,  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel  
Betreuung: Prof. Dr. Daniela Wesch  
*Semester: 8*

#### Hochschulstudium

10/2011 – 12/2013 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**  
*Biochemie und Molekularbiologie (M. Sc.), Semester: 5*  
Gesamtnote: 1,1

10/2008 – 09/2011 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**  
*Biochemie und Molekularbiologie (B.Sc.), Semester: 6*  
Gesamtnote: 1,8

#### Zivildienst

10/2007 – 06/2008 **Studentenwerk Schleswig-Holstein**, Kiel

#### Schulbildung

09/1998 – 06/2007 **Humboldt-Schule**, Kiel  
Note (Abitur): 1,6

## 6.7 Publikationsliste

### 6.7.1 Originalarbeiten

Oberg HH, Kellner C, **Gonnermann D**, Sebens S, Bauerschlag D, Gramatzki M, Kabelitz D, Peipp M, Wesch D. Tribody [(HER2)<sub>2</sub>xCD16] is more effective in enhancing  $\gamma\delta$  T cell and NK cell-cytotoxicity against HER2-expressing cancer cells than trastuzumab. *Frontiers in Immunology* 2018. Eingereicht.

Kaehler M, Ruemenapp J, **Gonnermann D**, Nagel I, Bruhn O, Haenisch S, Ammerpohl O, Wesch D, Bruckmueller H. MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells. *Oncotarget* 2017, 8(54):92018-92031.

Nerdal PT, Peters C, Oberg HH, Zlatev H, Lettau M, Quabius ES, Sousa S, **Gonnermann D**, Auriola S, Olive D, Määttä J, Janssen O, Kabelitz D. Butyrophilin 3A/CD277-Dependent Activation of Human  $\gamma\delta$  T Cells: Accessory Cell Capacity of Distinct Leukocyte Populations. *Ji* 2016, 197(8):3059-3068.

Oberg HH, Grage-Griebenow E, Adam-Klages S, Jerg E, Peipp M, Kellner C, Petrick D, **Gonnermann D**, Freitag-Wolf S., Röcken C, Sebens T, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Kabelitz D, Wesch D, Sebens S. Monitoring and functional characterization of the lymphocytic compartment in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreatology* 2016, 16: 1069-1079.

Oberg HH, Kellner C, **Gonnermann D**, Peipp M, Peters C, Sebens S, Kabelitz D, Wesch D.  $\gamma\delta$  T cell activation by bispecific antibodies. *Cell Immunol*, 2015, 296:41-9.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kellner C, Peipp M, Sebens S, Kabelitz D, Wesch D. Cyclooxygenase-2 expressing pancreatic ductal adenocarcinoma cells are resistant against  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity. *OncoImmunology* 2015, 4:e988460.

### 6.7.2 Vortrag und Posterpräsentationen

Kaehler M, Bruckmueller H, Ruemenapp J, Murgas-Penas E, **Gonnermann D**, Ammerpohl O, Nagel I, Cascorbi I. Insights into drug resistance – comparison of miRNA, mRNA and me-

thylation profiles of imatinib and nilotinib resistant leukemic cells. 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). Heidelberg 2017.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Tumor cell released Galectin-3 reduces proliferation of  $\gamma\delta$  T cells. 20th Meeting of the Signal Transduction Society. Weimar 2016.

Hermes M, Kellner C, Peipp M, **Gonnermann D**, Oberg HH, Wesch D. Impact of bispecific antibodies on the signaling pathways of T cells interacting with tumor cells. 39th Meeting of the North German Immunologists. Borstel 2016.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Tumor cell released Galectin-3 reduces proliferation of  $\gamma\delta$  T cells. 39th Meeting of the North German Immunologists. Borstel 2016.

Sulaj V, **Gonnermann D**, Ussat S, Groth C, Bauerschlag D, Kellner C, Peipp M, Kabelitz D, Oberg HH, Wesch D. Modulation of T cell cytotoxicity against ovarian carcinoma by extrinsic factors. 39th Meeting of the North German Immunologists. Borstel 2016.

Groth C, **Gonnermann D**, Oberg HH, Trauzold A, Wesch D. Influence of TRAIL-R4 on  $\gamma\delta$  T cell-mediated cytotoxicity. Studierendentagung. Kiel 2016.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Is the release of Galectin-3 in the interaction of PDAC tumor cells and T cells a tumor-escape mechanism? 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI). Hamburg 2016.

Oberg HH, Hermes M, Peipp M, Kellner C, Peters C, **Gonnermann D**, Sebens S, Kabelitz D, Wesch D. Bispecific antibodies differentially activate  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity. 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI). Hamburg 2016.

Wesch D, **Gonnermann D**, Kellner C, Peipp M, Hermes M, Peters C, Sebens S, Kabelitz D, Oberg HH. Novel tribody as promising candidate for  $\gamma\delta$  T cell-based immunotherapy. 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI). Hamburg 2016.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Galectin-3 is released in the interaction of PDAC tumor cells and T cells. 7th International  $\gamma\delta$  T cell conference. London, UK 2016.

## 6 Anhang

Oberg HH, Hermes M, Peipp M, Kellner C, Peters C, **Gonnermann D**, Sebens S, Kabelitz D, Wesch D. Differential activation of  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity by bispecific antibodies. 7th International  $\gamma\delta$  T cell conference. London, UK 2016.

Wesch D, **Gonnermann D**, Kellner C, Peipp M, Hermes M, Peters C, Sebens S, Kabelitz D, Oberg HH. An attractive tool for  $\gamma\delta$  T cell-based immunotherapy. 7th International  $\gamma\delta$  T cell conference. London, UK 2016.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Galectin-3 is released upon interaction of T cells with PDAC tumor cells. 38th Meeting of the North German Immunologists. Borstel 2015.

Jonescheit H, **Gonnermann D**, Oberg HH, Wesch D. Overexpression of indolamine-2,3-dioxygenase as mechanism of interference in  $\gamma\delta$  T cell-mediated lysis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). 38th Meeting of the North German Immunologists. Borstel 2015.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Galectin-3 plays a role in the interaction of PDAC tumor cells and T cells. 19th Meeting of the Signal Transduction Society. Weimar 2015.

Jonescheit H, **Gonnermann D**, Oberg HH, Wesch D. Impact of indolamine-2,3-dioxygenase on  $\gamma\delta$  T cell-mediated lysis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). 19th Meeting of the Signal Transduction Society. Weimar 2015.

Oberg HH, Peipp M, Kellner C, **Gonnermann D**, Peters C, Sebens S, Kabelitz D, Wesch D. Novel tribody [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] is an attractive candidate to enhance  $\gamma\delta$  T cell-cytotoxicity against pancreatic tumor cells. 19th Meeting of the Signal Transduction Society. Weimar 2015.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Resistance of certain pancreatic cancer cells towards  $\gamma\delta$  T cell-mediated lysis can be overcome by a combination of tribody [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] and Cox-2 inhibitor. 37th Meeting of the North German Immunologists. Borstel 2014.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Die Resistenz von Pankreastumorzellen

gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zell vermittelter Lyse kann durch die Kombination des bispezifischen Antikörpers [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] mit einem Cox-2 Inhibitor überwunden werden. Studierendentagung. Kiel 2014.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Kellner C, Peipp M, Kabelitz D, Wesch D. Combination of tri-body [(Her2)<sub>2</sub>xV $\gamma$ 9] and Cox-2 inhibitor enhances the cytotoxic activity of  $\gamma\delta$  T-cells against resistant pancreatic cancer cells. 6th Autumn School of the German Society for Immunology. Merseburg 2014.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Wesch D. Cox-2 derived PGE2 is responsible for differential lysis of PDAC cells by  $\gamma\delta$  T cells. 44th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI). Bonn 2014.

**Gonnermann D**, Oberg HH, Wesch D. PGE2 release of PDAC cells inhibits  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity. 6th International  $\gamma\delta$  T cell conference. Chicago, USA 2014.

### 6.7.3 Preise und Auszeichnungen

- Best-Poster-Award, NDI, Borstel 2016
- Reisestipendium der STS zum STS-Meeting in Weimar 2016
- Stipendium der R&D Systems Inc. zur Teilnahme am Amerikanischen Immunologenkongress, New Orleans 2015, USA
- Reisestipendien des DAAD zu den  $\gamma\delta$  T Zellkonferenzen in Chicago 2014, USA, und London 2016, UK
- Reisestipendium der DGfI zur  $\gamma\delta$  T Zellkonferenz in Chicago 2014, USA

## 6.8 Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät und Technischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 31. August 2012, dass die vorliegende Arbeit abgesehen von der Beratung meiner Betreuerin Prof. Dr. Daniela Wesch die eigene Arbeit ist. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und hat weder ganz noch in Teilen im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Auszüge dieser Arbeit wurden bei Fachzeitschriften veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, Februar 2018

---

Daniel Gonnermann

## 6.9 Danksagung

Ich möchte Frau Prof. Dr. Daniela Wesch und Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz danken für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit nach meiner Masterarbeit auch meine Dissertation im Institut für Immunologie anfertigen zu können. Herzlichen Dank an Dani und Heiner für die tägliche Betreuung und Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Fragen, sowie für das kritische Lesen der Arbeit. Die ständige Hilfsbereitschaft hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme des 2. Gutachtens von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Vielen Dank an Ina, Hoa, Moni und besonders Sandra für die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die meine Arbeit so bereichert und erleichtert haben.

Meinen Doktoranden- und Postdoc-Kollegen und Kolleginnen Marie, Guranda, Pit und Marcus möchte ich danken für die vielen gemeinsamen Abende sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen und die ständige Unterstützung bei allen Fragen. Ebenso möchte ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Instituts für Immunologie danken für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima. Insbesondere die vielen Geburtstagsfrühstücke werden mir in Erinnerung bleiben.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und besonders Laura bedanken für die Unterstützung, den Rückhalt und die Nachsicht, wenn der Tag im Labor mal wieder länger wurde.