

Epigenetic analysis of human $\gamma\delta$ T lymphocytes



Dissertation

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

vorgelegt von

Jaydeep Bhat

Kiel, 2017

First referee: Prof. Dr. Dr. Thomas Bosch

Second referee: Prof. Dr. Dieter Kabelitz

Date of the oral examination: 14.03.2017

Approved for publication: 14.03.2017

Summary

Human $\gamma\delta$ T-cells have emerged as key players in diverse immune responses both in health and disease. Such a dynamic functional diversity of cells is controlled at various levels of (epi)genetic regulation in an orchestrated manner. However, a comprehensive overview of epigenetic mechanisms dictating human $\gamma\delta$ T-cell development, regulation and molecular function is largely missing. The present thesis aims at elucidating the epigenetic landscape of human $\gamma\delta$ T-cells by mainly two distinct approaches. In a first approach based on in vitro culture, the NKG2D ligand expression and release, and its further implications on NKG2D receptor expression by epigenetic inhibitors such as histone deacetylase inhibitor valproic acid, a drug widely used in the clinic, was studied. The modulation of NKG2D receptor expression and function of $\gamma\delta$ T cells in co-culture with pancreatic carcinoma and prostate carcinoma tumor cell lines were addressed. Additionally, the effect on functional responses of $\gamma\delta$ T-cells upon treatment with valproic acid provided new insight into $\gamma\delta$ T-cell subset-specific responses. Specifically, valproic acid induced changes in molecular and cellular responses of human $\gamma\delta$ T-cells, specifically by enhanced expression of the non-secretory form of IL-4, regulation of cell death and induction of global histone acetylation (H3K9ac).

In a second approach, the “endogenous” molecular regulation of peripheral $\gamma\delta$ T-cells in comparison to $\alpha\beta$ T-cells were deciphered using highly sensitive assays for chromatin accessibility, DNA methylation and RNA expression. Next generation sequencing-based preliminary results showed differential expression of genes clearly distinguishing $\gamma\delta$ T-cells from other T-cell subsets. The mRNA expression profile of $\gamma\delta$ T cells was analyzed in parallel to access the involvement of regulatory RNA i.e. miRNA and lncRNA that control the transcriptional signature of $\gamma\delta$ T cells. The RNA expression and regulation was further complemented by analyses of DNA methylation and chromatin accessibility. Moreover, the integration of all these multiple layers of epigenetic regulations resulted in a unique set of genes clearly separating $\gamma\delta$ T cells from CD4, Treg and CD8 T cells. $\gamma\delta$ T-cell signatures were mainly associated with $\gamma\delta$ T-cell development and activation pathways. Our research based on (epi)genetic mechanisms will broaden the characterization of human $\gamma\delta$ T-cells and thereby contribute to a better understanding of basic features of $\gamma\delta$ T cells especially with respect to immunotherapeutic application.

Zusammenfassung

$\gamma\delta$ T Zellen sind sowohl bei Gesunden als auch in Patienten als wichtige zelluläre Komponente der Immunantwort identifiziert worden. Die dynamische funktionelle Plastizität von Zellen wird auf unterschiedlichen Ebenen, insbesondere aber auf epigenetischer Ebene reguliert. Bisher fehlte allerdings eine genaue Charakterisierung der epigenetischen Mechanismen, welche die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen steuern. Das Ziel dieser Dissertation war die Aufklärung der epigenetischen „Landschaft“ von human $\gamma\delta$ T-Zellen auf zwei Wegen. Zum einen sollte in in vitro Kultursystemen die epigenetische Regulation der NKG2D-Rezeptor und -Ligand Expression sowie des NKG2D Ligand „Sheddings“ durch Verwendung des Histon-Deazetylase-Inhibitors Valproinsäure (VPA) untersucht werden. VPA wird bereits therapeutisch in der Klinik eingesetzt. Die Modulation des NKG2D-Rezeptors und die Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen nach Behandlung mit VPA wurden in Kokulturen mit Prostata- und Pankreas-Tumorzellen untersucht. Ferner wurden Untersuchungen zum Einfluss von VPA auf Marker-Expression und Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass VPA Veränderungen von $\gamma\delta$ T-Zellen auf molekularer und zellulärer Ebene induzierte und insbesondere die Expression einer nicht-sezernierten IL-4 Variante sowie die Regulation von Zelltod und globaler Histon-Azetylierung (H3K9ac) modulierte.

In einem weiteren Teil wurde die „endogene“ molekulare Regulation von peripheren Blut $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen mittels hochsensitiver Methoden zur Analyse des Chromatin-Zugänglichkeit, der DNA-Methylierung sowie der RNA-Expression untersucht. Next-generation-sequencing (NGS)-basierte vorläufige Ergebnisse konnten eindeutig die Expression und Regulation bestimmter Gene identifizieren, welche $\gamma\delta$ T-Zellen klar von anderen T-Zellpopulationen abgrenzen. Parallel zu dem mRNA-Expressionsprofil von $\gamma\delta$ T-Zellen wurden auch regulatorische RNAs wie miRNA und lncRNA untersucht, welche die transkriptionelle Signatur von $\gamma\delta$ T-Zellen kontrollieren. Zusätzlich zur RNA-Expression und Regulation wurden auch DNA-Methylierung sowie die Chromatin-Zugänglichkeit untersucht. Die bioinformatische Integration dieser unterschiedlichen Regulationsebenen ergab Hinweise auf die Expression und Regulation spezifischer Gene, welche $\gamma\delta$ T-Zellen eindeutig von anderen T-Zellpopulationen wie CD4, CD8 und Treg abgrenzen. Diese $\gamma\delta$ T-Zell- „Signaturen“ waren u.a. mit $\gamma\delta$ T-Zell-Entwicklung und -Aktivierung assoziiert. Diese Ergebnisse tragen entscheidend

zur weiteren Charakterisierung der Besonderheiten humaner $\gamma\delta$ T-Zellen bei. Ferner erlauben die Ergebnisse eine bessere Klassifizierung von $\gamma\delta$ T-Zellen, was insbesondere für die weitere therapeutische Anwendung von $\gamma\delta$ T-Zellen von großer Bedeutung ist.