

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Professor Dr. med. Dietrich Kabelitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

**Modulation der Tumorreaktivität humaner $\gamma\delta$ T Lymphozyten
durch Toll-like Rezeptor Agonisten**

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

vorgelegt von

Amir Hamed Shojaei

aus Isfahan (Iran)

Kiel 2016

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Daniela Wesch

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Heiner Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung:

09.03.2017

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

26.11.2016

gez.:

Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Tumorerkrankungen | 1 |
| 1.2 Das angeborene Immunsystem..... | 2 |
| 1.3 Das erworbene (adaptive) Immunsystem..... | 3 |
| 1.3.1 $\alpha\beta$ T-Lymphozyten | 4 |
| 1.3.2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten | 5 |
| 1.3.3 Natürliche Killer Rezeptoren..... | 7 |
| 1.4 Toll-like Rezeptoren..... | 9 |
| 1.4.1 TLR3 und TLR7 | 10 |
| 2 Fragestellung | 12 |
| 3 Material und Methoden | 13 |
| 3.1 Material | 13 |
| 3.1.1 Medien..... | 13 |
| 3.1.2 Zytokine und Stimuli..... | 13 |
| 3.1.3 Antikörper | 14 |
| 3.1.4 Puffer und Lösungen | 16 |
| 3.1.5 Test-Kits | 17 |
| 3.1.6 Membranen und Filter | 17 |
| 3.1.7 Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 3.1.8 Geräte | 18 |
| 3.2 Methoden..... | 18 |
| 3.2.1 Ethikvotum | 18 |
| 3.2.2 Zelllinien | 18 |
| 3.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut..... | 19 |
| 3.2.4 Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien aus Aszites | 20 |
| 3.2.5 Bestimmung der Zellzahl und ihrer Vitalität..... | 20 |
| 3.2.6 Kryokonservierung von Zellen..... | 20 |
| 3.2.7 Zellseparation mit dem Magnet-aktivierten Zellsorter (MACS)..... | 21 |
| 3.2.8 Immunfluoreszenz | 22 |
| 3.2.9 51 Chromium-Freisetzungstest | 24 |
| 3.2.10 Enzymgekoppelte immunochemische Analyse (ELISA)..... | 25 |
| 4 Ergebnisse | 28 |
| 4.1 Unterschiedliche Aktivierbarkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem im peripheren Blut und aus Aszites von Tumorpatienten | 28 |
| 4.2 Der Einfluss von TLR Agonisten poly(I:C) und Imiquimod bei der $\gamma\delta$ T-Zell abhängigen Tumorumlyse verschiedener Tumorarten | 29 |
| 4.3 Einfluss von Aminobisphosphonaten (n-BP) auf die $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität | 34 |
| 4.4 Einfluss von poly (I:C) und Imiquimod auf Tumorzelltod | 38 |
| 4.5 Einfluss von poly(I:C) und Imiquimod auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen | 39 |
| 4.6 Einfluss von poly(I:C) und Imiquimod auf die Modulation von kostimulierenden Faktoren..... | 40 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---|---------------------------|----|
| 5 | Diskussion | 46 |
| 6 | Zusammenfassung | 55 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 56 |
| | Danksagung | 66 |
| | Lebenslauf | 68 |
| | Publikationsliste | 69 |
| | Erklärung..... | 70 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| Ag | Antigen |
| Ak | Antikörper |
| APZ | Antigen-präsentierende Zelle |
| BrHPP | Bromhydrin-Pyrophosphat |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin) |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> (Zelloberflächenantigene) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunsorbent Assay</i> (Enzymgekoppelte immunchemische Analyse) |
| FACS | Fluoreszenzaktivierter Zellsorter |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FFP | Farnesylpyrophosphat |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor |
| HLA | Humane Leukozyten-Antigene |
| HMB-PP | Hydroxymethylbutenyl-Pyrophosphat |
| HMG-CoA | β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA |
| ICAM | <i>Intracellular Adhesion Molecule</i> |
| IE | Internationale Einheit |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| ILT | <i>Immunglobulin-like Transcript</i> |
| IPP | Isopentenylpyrophosphat |
| ITAM | <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif</i> |
| ITIM | <i>Immunreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i> |
| KAR | <i>Killer Activating Receptor</i> (Killer aktivierender Rezeptor) |
| KIR | <i>Killer Inhibitory Receptor</i> (Killer inhibierender Rezeptor) |

| | |
|---------------|---|
| LFA | Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen |
| MACS | Magnet-aktivierter Zellsorter |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MICA/B | <i>MHC I-related chain A/B</i> |
| nBP | Aminobisphosphonat |
| NCR | <i>Natural Killer Cytotoxicity triggering Receptors</i> |
| n.g. | nicht getestet |
| NK-Zellen | Natürliche Killer-Zellen |
| PAg | Phosphoantigen |
| PAMP | Pathogen-assoziierte molekulare Muster |
| PBMZ | Periphere mononukleäre Blutzellen |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PI | Propidiumjodid |
| Poly(I:C) | Polyinosinsäure:Polycytidinsäure |
| TLR | <i>Toll-like Receptor</i> |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor alpha |
| TZR | T-Zellrezeptor |
| ULBP | UL-16 bindende Proteine |

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Krebserkrankungen oder auch im engeren Sinne maligne Neoplasien sind eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Nation. In Deutschland belegen sie nach Herzkreislauf- und Lungenerkrankungen Platz 3 in der Todesstatistik. Dabei kann die Krebserkrankung nicht nur jedes Organ betreffen, sondern auch altersunabhängig auftreten. Daneben bestehen geographische, ethnische und geschlechtliche Unterschiede. Die Häufigkeit der meisten malignen Neoplasien steigt jedoch mit zunehmendem Alter. Die verbesserte Lebensqualität gefolgt von einer hoch entwickelten medizinischen Versorgung tragen vor allem dazu bei, dass die Bevölkerung in den Industrieländer immer älter werden und damit den Grundbaustein für die Karzinomentstehung legen. Neben dem Alter spielen natürlich auch physikalische Noxen (z.B. Strahlung), familiäre Disposition, Onkoviren und chemische Noxen (z.B. Rauchen) eine Rolle in der Karzinogenese. Chemische Substanzen, Viren oder ionisierende Strahlung können zu Mutationen von Protoonkogenen führen, die u.a. bei der Zellproliferation eine wichtige Rolle spielen. Durch Mutationen entstehen aus Protoonkogenen Onkogene, die einen negativen Einfluss auf die Zellteilung, das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung haben und Tumorstadium fördern. Die Deletion oder Mutation eines Tumorsuppressorgens erhöht vergleichbar den Mutationen von Protoonkogenen die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung. DNA-Reparaturgene und Apoptosegene spielen bei Reparaturvorgängen, bei Misslingen der Fehlerbehebung sowie bei der Apoptose eine wichtige Rolle. Kommt es nun zu einer Schädigung in einem dieser Gene, entweder durch einen Kopierfehler oder durch eine angeborene Mutation, können die von diesem Gen überwachten Teilschritte nicht adäquat begleitet werden. Folglich können in den nächsten Zellgenerationen Defekte entstehen. Ist dann ein weiteres Gen betroffen, so potenziert sich der Effekt fortlaufend. Wenn dann Tumorsuppressorgene wie z.B. p53 betroffen sind, die in einer solchen Situation den Zelltod auslösen müssten, werden die Zellen unsterblich. Resultat dieser Kettenreaktion ist die Tumorgenese.

Neben verschiedenen Therapiemöglichkeiten, welche Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie beinhalten und teilweise erfolgreich eingesetzt werden, versucht auch das eigene Immunsystem, die unkontrolliert wachsenden Zellen zu bekämpfen. Zusätzlich übernimmt das Immunsystem Aufgaben in der Abwehr von eingedrungenen Pathogenen und bei Entzündungen, welche sich in einer Erhöhung bestimmter Parameter (Leukozytose) widerspiegeln.

Das Immunsystem lässt sich in die angeborene und erworbene Form einteilen, wobei die beiden Komponenten ineinander übergreifen und eng zusammen arbeiten. Aufgrund dieser Symbiose ist eine maximale Immunabwehr gewährleistet. Während die angeborene Immunität auf zellulärer Ebene mit seinen Hauptkomponenten, den Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen und mit sogenannten Effektormolekülen wie z.B. Komplementfaktoren die erste Linie der Abwehr bildet, stellt das adaptive Immunsystem mit seinen Effektorzellen vornehmlich Zellen der spezifischen Abwehr dar. Diese Effektorzellen umfassen T- und B-Lymphozyten, welche von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark stammen und im lymphatischen Gewebe wie Thymus (T-Lymphozyten) und Knochenmark (B-Lymphozyten) zu effektiven immunkompetenten Zellen reifen. Diese sind dann nicht nur in der Lage zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden, sondern auch dafür bekannt Gedächtniszellen gegen bekannte Erreger zu generieren, welches die Voraussetzung für ein funktionierendes Immunsystem darstellt. So können diese Erreger beim zweiten Mal schneller erkannt und effizienter abgewehrt werden. Die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses ist auch Grundlage für Impfungen. Folglich bestimmt das angeborene Immunsystem die frühe Phase der Immunantwort, während das erworbene durch seine Spezialisierung einige Tage später in Aktion tritt. Trennen kann man die beiden Systeme aber nicht, sondern muss sie eher als eine funktionierende Einheit betrachten, da nur so die Fähigkeit der optimalen Immunüberwachung gegeben ist.

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt nach den mechanischen Barrieren, bestehend aus der Haut und Schleimhaut, die erste Front der Immunabwehr. Bei Überwinden der mechanischen Barrieren stoßen die Pathogene auf ein komplexes Netzwerk aus zellulären Faktoren (z.B. Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen) und humoralen Faktoren (z.B. C-reaktives Protein, Komplementfaktoren, proteolytische Enzyme, Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide wie z.B. das Lysozym). Durch Chemotaxis können Zellen der angeborenen Immunabwehr beispielweise zu einem Entzündungsgeschehen gelockt werden. Zellen der angeborenen Immunabwehr wie die Makrophagen exprimieren z.B. Mannose-, Dectin-1-, Scavenger- und Toll-like-Rezeptoren (TLR), die bakterielle, virale oder parasitäre Komponenten erkennen und diese Pathogene über Rezeptor-vermittelte Endozytose, Phagozytose oder Pinozytose internalisieren können. Die Keimbahn-kodierten TLR sind Muster-Erkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, *PRR*), welche an hoch konservierte Struktur motive von Mikroben (*pathogen-associated molecular pattern*, *PAMPs*)

oder *microbe-associated molecular patterns*, MAMPs) binden. PAMPs oder MAMPs können z.B. Kohlenhydrat- oder Lipidgruppen, Einzelstrang RNA oder Doppelstrang DNA binden, die für mikrobielle Oberflächen oder für Viren charakteristisch sind (Hennessy et al., 2010). Die Expression von TLR Rezeptoren wurde zuerst auf Zellen der angeborenen Immunität wie z.B. NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen entdeckt und später auch auf Zellen der erworbenen Immunabwehr wie den T-Zellen. Während für die Aktivierung der TLR auf Zellen der angeborenen Immunwehr die entsprechenden TLR Agonisten sowie vereinzelt Korezeptoren erforderlich sind, erfolgt bei T-Zellen nur eine Aktivierung über TLR wenn gleichzeitig der T-Zellrezeptor (TZR) aktiviert wird (Wesch et al., 2006; Pietschmann et al., 2009; Wesch et al., 2011).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dienen der Virusabwehr und Zerstörung von entarteten Zellen, während Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie Makrophagen oder dendritische Zellen (DC) Erreger aufnehmen, prozessieren und präsentieren. Prozessierte Peptide von Pathogenen (sogenannte Antigene) werden an Humane Leukozyten Antigene (HLA)-Moleküle oder in der Maus an Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle gebunden und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem präsentiert.

1.3. Das erworbene (adaptive) Immunsystem

Das adaptive Immunsystem besteht aus zwei Populationen, den B- und T-Lymphozyten, welche spezifische Oberflächenrezeptoren exprimieren mit deren Hilfe sie Antigene (pathogene Bestandteile) erkennen können. Der B-Zell-Rezeptorkomplex kann mit seinem membranständigen Immunglobulin spezifisch Antigene in ihrer nativen Form erkennen. Diese Bindung führt dann über eine definierte Aktivierungskaskade zur Expansion dieser Population und der Differenzierung zu Plasmazellen. Die entstandenen Plasmazellen sind in der Lage Immunglobuline zu produzieren, welche die gleiche Spezifität wie die membrangebundenen Antikörper aufweisen. Nach erfolgreicher Auseinandersetzung mit den pathogenen Keimen, geht ein Teil der Effektorzellen durch Apoptose zugrunde, während der andere Teil zu Gedächtniszellen differenziert und bei erneuter Infektion mit den gleichen Pathogenen eine effizientere Immunantwort auslöst. B-Lymphozyten besitzen auch die Fähigkeit Antigene über HLA-Moleküle den T-Lymphozyten zu präsentieren.

Neben den B-Lymphozyten bilden die T-Lymphozyten die zweite Säule des adaptiven Immunsystems. Diese Population entwickelt sich im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen und erfährt seine Ausreifung im Thymus. Im ausgereiften Zustand exprimieren sie den T-Zellrezeptor (TZR), ein Heterodimer welches über Disulfidbrücken verbunden ist.

Aufgrund seiner Zweidomänenstruktur besitzt er eine große Ähnlichkeit zu Immunglobulinen, und wird daher zu der Immunglobulin-Superfamilie gerechnet.

Diese Rezeptoren, deren Diversität ähnlich wie bei den Immunglobulinen der B-Zellen, durch somatische Rekombination separater Gensegmente (V-, D-, und J-Segmente) auf DNS-Ebene während der Zellreifung entsteht, bilden mit ihren variablen Regionen die Antigenbindungsstelle, welche spezifisch Antigene wie z.B. Peptide im Kontext mit HLA- oder MHC-Molekülen erkennt. Durch die zufällige Kombination der Gensegmente entsteht eine enorme Vielfalt an Rezeptoren, welche durch zusätzliche, ungenaue Verknüpfungsmechanismen noch gesteigert werden (junktionale Diversität) (Davis et al., 1998).

1.3.1 $\alpha\beta$ T-Lymphozyten

Ungefähr 90% der peripheren T-Lymphozyten exprimieren einen TZR, der aus einer α -Kette und einer β -Kette besteht, welche extrazellulär über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind.

Abhängig von der Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 lassen sich T-Lymphozyten klassisch in T-Helferzellen (T_H) und in zytotoxische T-Zellen (T_C) einteilen. Dabei befindet sich der Korezeptor CD4 auf der Oberfläche der T-Helferzellen, während CD8 auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird. Neuere Publikationen zeigen, dass auch eine kleine Population der CD4 T-Lymphozyten zytotoxisch sein kann bzw. CD8 T-Lymphozyten auch CD4 T-Zellen helfen können (van de Berg et al., 2008; Huber et al., 2015). CD4 T-Zellen sind in ihrer Antigenerkennung HLA bzw. MHC-Klasse II und CD8 T-Zellen MHC-Klasse I restringiert. Die akzessorischen Moleküle CD4 und CD8 erhöhen auf den T-Zellen die Avidität zu den APZ. Sowohl CD4 als auch CD8 T-Lymphozyten können abhängig vom Antigen, welches sie erkennen, und dem umgebenden Zytokinmilieu in mehrere Subpopulationen eingeteilt werden, die unterschiedliche Zytokine produzieren. T_H1 -Zellen produzieren im Wesentlichen Interleukin (IL)-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), aktivieren Makrophagen und dienen vornehmlich der Abwehr intrazellulärer Erreger. Im Unterschied zu den T_H1 -Zellen, produzieren T_H2 -Zellen IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31 und IL-33, aktivieren B-Zellen und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr extazellulärer Pathogene (van de Berg et al., 2008). Während T_H9 - und T_H22 -Zellen (IL-9 bzw. IL-22 Produzenten) im entzündeten Gewebe auftauchen, scheinen T_H9 als auch T_H17 Zellen (IL-17A/E, IL-6, IL-8, IL-22 und IL-26) in der Pathogenese von

Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eine Rolle zu spielen (van de Berg et al., 2008). Regulatorische T-Zellen unterdrücken die Aktivierung einer Immunabwehr und regulieren dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems (Ohkura et al., 2013).

CD4/CD8-negative und CD8⁺ $\gamma\delta$ T Lymphozyten sowie zytotoxische CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen (TC1, TC2, TC9, TC17) produzieren vergleichbare Zytokine wie T-Helferzellen. Die Aufgabe der TC1 besteht in der Erkennung virusinfizierter oder mit intrazellulären Pathogenen infizierter Zellen. Zusätzlich sind sie auch in der Lage verschiedene tumorspezifische Antigene zu erkennen und diese zu lysieren (Wesch et al., 2001; Huber et al., 2015; Ness-Schwickerath et al., 2011). TC2 und TC9-Zellen spielen in der Pathologie von Allergien wie Asthma eine Rolle und TC17-Zellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems (Huber et al., 2015).

Der TZR ist mit dem CD3-Komplex assoziiert. Um eine Aktivierung und der damit verbundenen Differenzierung der T-Zellen zu reifen Effektorzellen zu erreichen, reicht der alleinige TZR-Stimulus nicht aus. Voraussetzung sind zusätzliche Signale, welche durch Rezeptor-Liganden-Interaktionen vermittelt werden. Diese werden ihnen z.B. in Form der Oberflächenmoleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) von APZ geliefert. CD80 und CD86 binden an die Rezeptoren CD28 und CTLA-4 (CD152) auf der Oberfläche von T-Zellen (Gross et al., 1992). Während die Interaktion mit CD28 zu einer Expansion naiver T-Zellen führt, beendet die Bindung an CTLA-4 die proliferative Phase der Immunantwort durch ein inhibitorisches Signal. Weitere kostimulatorische Signale, die in der T-Zell Aktivierung modulierend wirken sind: CD40-L/CD40, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD70, CD134/CD134-L und ICOS/ICOS-L, wobei der Erste auf T-Zellen und der Zweite auf APZ exprimiert wird (Watts and DeBenedette, 1999).

1.3.2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Neben $\alpha\beta$ TZR-exprimierenden T-Zellen, gibt es eine numerisch kleine Population (ca. 1-10 %) der peripheren T-Lymphozyten, welche ein $\gamma\delta$ Heterodimer als Antigenrezeptor tragen (Lanier et al., 1987). Der $\gamma\delta$ TZR ist ebenfalls mit dem CD3 Zelloberflächenmolekül assoziiert. Die Gensegmente der γ -Kette bestehen aus sechs funktionellen V-, 5 J- und 2 C-Elementen, die sich auf Chromosom 7 befinden. Die Gensegmente der δ -Kette befinden sich innerhalb der $V\alpha$ -Gensegmente auf Chromosom 14 (8 V-, 3 J- und 1 C-Element) und enthalten zusätzlich 3 D-Segmente. Durch die Addition weiterer Nukleotide (N- und P-Nukleotide) wird die Diversität der $\gamma\delta$ Rezeptorketten trotz der geringen Anzahl der V-Gene

um ein Vielfaches gesteigert (Arden et al., 1995; Hayday., 2000). Neben der eingeschränkten Rekombination ist auch die Paarung der Rezeptorketten und das Vorkommen bestimmter $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen restringiert. V δ 2 assoziiert meist mit V γ 9 und ist hauptsächlich im Blut zu finden (nach der Huck-Nomenklatur) (Huck et al., 1988). V δ 1-Ketten sind dagegen meist mit V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5 oder V γ 8 gepaart und kommen in vermehrter Anzahl in der Mukosa vor (ca. 30% der T-Zellen), welche die intestinalen Epithelien einschließt (Hinz et al., 1997; Kabelitz et al., 2005).

Im Unterschied zu den $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen meist keine der Korezeptoren CD4 und CD8 und können damit als „doppelt negativ“ bezeichnet werden. Das weitgehende Fehlen dieser beiden Korezeptoren erklärt möglicherweise die nicht HLA bzw. MHC-restringierte Erkennung von Antigenen. Nebst ihrer anti-bakteriellen und anti-viralen Kapazität können $\gamma\delta$ T-Lymphozyten Tumore infiltrieren und besitzen eine hohe zytotoxische Aktivität gegenüber unterschiedlichen Tumoren, die HLA unabhängig sind ist (Helm et al., 2014; Wilhelm et al., 2014; Bertaina et al., 2014). $\gamma\delta$ T-Lymphozyten bereichern das Antigenerkennungsrepertoire des Immunsystems, indem sie andere Antigene als $\alpha\beta$ T-Lymphozyten erkennen. Die V γ 9V δ 2-exprimierenden $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen phosphorylierte Zwischenprodukte eines in Tumorzellen dysregulierten Isoprenoid Biosyntheseweges zur Synthese von beispielsweise Cholesterol. Das Phosphoantigen (PAg) Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) wird in einigen Tumorzellen in höheren Konzentrationen produziert als in gesunden Zellen (Gober et al., 2003; Jauhainen et al., 2009).

Nach PAg-Stimulation expandieren $\gamma\delta$ T-Zellen selektiv auf das 800-1000 fache. Da die endogene PAg Konzentration in Tumoren jedoch nicht immer ausreichend hoch ist, um eine selektive Expansion von V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten zu induzieren, können therapeutisch zugelassene Medikamente wie Nitrogen-haltige- (Amino-) bisphosphonate (n-BP) benutzt werden. N-BP werden in der Klinik zur Behandlung von Osteoporose und Knochenmetastasen eingesetzt und steigern die Freisetzung von PAg in den Tumorzellen (Chiplunkar et al., 2009; Kunzmann et al., 2000). Die Aktivierung der V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen durch synthetische PAg oder n-BP *in vivo* oder dem adoptiven Transfer von *ex vivo* isolierten V γ 9V δ 2 T-Zellen nach deren *in vitro* Expansion führte bei in einigen klinischen Studien mit Non-Hodgkin Lymphomen, Multiplen Myelomen sowie mit Prostata-, Brust- bzw. Nieren-Karzinomen zu einer partiellen Tumorreduktion in Patienten (Dieli et al., 2007; Meraviglia et al., 2010; Kunzmann et al., 2000 und 2012; Kobayashi et al., 2007).

$\gamma\delta$ T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer hohen funktionellen Plastizität zunehmend attraktiver für immuntherapeutische Strategien. Die Plastizität der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten äußert sich u.a. darin, dass sie Eigenschaften der Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität auf sich vereinen (Beetz et al., 2007).

Sie exprimieren einen TZR und benötigen kostimulatorische Signale vergleichbar den Zellen der erworbenen Immunabwehr und sie exprimieren TLR und fungieren als „professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie die Zellen der angeborenen Immunabwehr. Vergleichbar den APZ können sie Tumorantigene aus absterbenden Tumorzellen aufnehmen und präsentieren diese $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, wodurch eine tumorspezifische $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellantwort induziert werden kann (Brandes et al., 2009; Himoudi et al., 2012; Wesch et al., 2011). Zudem fördern sie über die Produktion ihrer Zytokine die Reifung von anderen APZ wie z.B. den dendritischen Zellen oder können regulatorische Funktionen übernehmen (Conti et al., 2005; Wesch et al., 2014).

Eine *in vivo* Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten erfordert eine repetitive Stimulation derer, die jedoch zu einer Art Erschöpfung und/ oder zum Zelltod der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten führen kann (Dieli et al., 2007; Braza et al., 2012; Cosica et al., 2012). Diese Erschöpfung könnte möglicherweise durch eine Verstärkung der Zytotoxizität durch TLR-Agonisten reduziert werden.

1.3.3 Natürliche Killer Rezeptoren

Natürliche Killerrezeptoren (NKR) werden meist auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, jedoch auch auf einem Teil der Zellen des adaptiven Immunsystems. NKR sind nicht nur auf NK-Zellen, sondern auch auf $\gamma\delta$ T-Zellen sowie $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert (Uhrberg et al., 2001). Die multigenetische Familie der Natürlichen Killer Rezeptoren (NKR) lässt sich in drei verschiedene Hauptgruppen unterteilen: den C-Typ Lektin-ähnlichen Heterodimeren CD94-NKG2, den zytotoxischen Rezeptoren [NKG2-D, natürliche zytotoxische Rezeptoren (*Natural killer Cytotoxicity triggering Receptors*, NCR)] und den Killerzellen Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Rezeptoren (*Killer Inhibiting Receptors*, KIRs) (O'Connor et al., 2006; Rajalingam 2012).

NKR binden an Humane-Leukozyten-Antigene (HLA)-Klasse-I-Moleküle und vermitteln aktivierende oder inhibitorische Signale, welche die zytotoxische Aktivität der Zielzelle regelt. Inhibitorische NKR besitzen ein *tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM), ein inhibitorisches Sequenzmotiv, während aktivierende NKR sogenannte *tyrosine-based*

activitory motifs (ITAM), aktivierende Sequenzmotive, besitzen (Rajalingan 2012; Parham, 2005).

Die C-Typ Lektin-ähnlichen Heterodimere wie z.B. die NKG2-Familie besteht aus inhibierenden- [z.B. NKG2-A (CD159A) und NKG2-B] und aktivierenden [z.B. NKG2-C (CD159c), NKG2-E und -F] Rezeptoren. Die NKG2 Familie bildet mit CD94 ein Heterodimer und greift über diesen CD94 gebundenen Komplex in den Aktivitätshaushalt der Zelle ein. Die Signalweiterleitung für CD94/NKG2-C, -E und -F übernimmt DAP12, das als Signal-transduzierendes Element ein ITAM enthält. Ligand der inhibierenden Rezeptoren CD94/NKG2A und B wie auch der aktivierenden Rezeptoren CD94/NKG2C, E und F ist HLA-E (Kaisers et al., 2005; Kim et al., 2004).

Eine Ausnahme stellt der NKG2D-Rezeptor dar, welcher immer als Homodimer vorliegt und zu den NCR und den *Killer Activating Receptors* (KAR) gezählt wird. Nach Upshaw und Kollegen (2006) ist dieses Homodimer mit dem Protein DAP10 assoziiert, welche morphologisch den ζ -Ketten des TZR ähnelt und ebenfalls als Homodimer vorliegt. Zwei DAP10-Homodimere bilden mit einem NKG2D-Homodimer eine hexamere Struktur (Garrity et al., 2005). Das DAP10 enthält ein YxxM Sequenz, die nach der Phosphorylierung an die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase bindet (Wu et al., 1999). Weiterhin wichtig für die Induktion von NKG2D und der Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen scheint die Anwesenheit von IL-15 zu sein, das bei Stress von Epithelzellen gebildet wird (Roberts et al., 2001; Ohteki et al., 2002). Zusätzlich agiert NKG2D selbst als kostimulatorischer Rezeptor bei der TZR-abhängigen Aktivierung von humanen CD8 T-Zellen, $V\gamma9V\delta2$ - und darmassoziierten intraepithelialen $V\gamma1V\delta1$ $\gamma\delta$ T-Zellen (Groh et al., 2001; Bauer et al., 1999; Das et al., 2001; Wrobel et al., 2008). NKG2D erkennt MICA und MICB (*MHC-class-I chain-related A or B gene*), deren Gene auf demselben Chromosomen wie die für MHC-Klasse-I liegen (Chromosom 6). Dabei sind beide Liganden hochpolymorph, bisher sind 54 menschliche MICA-Allele bekannt (Steinle et al., 1998). Üblicherweise werden sie bei zellulären Stress vermehrt exprimiert und sind vor allem auf Fibroblasten zu finden. Jedoch sind auch einige Tumorzellen in der Lage durch Abspaltung von MICA der T-Zell-Zytotoxizität zu entkommen, indem das lösliche MICA an NKG2D bindet und die Expression von NKG2D auf der Oberfläche herunterreguliert bzw. ein negatives Signal auslöst (Groh et al., 2002; Märten et al., 2006; Chitadze et al., 2013). Neben den Liganden MICA und B erkennt der NKG2D die eng mit diesen beiden verwandten UL-16 bindenden Proteine

(ULBP) (Cosman et al., 2001; Cao et al., 2004). Analog zu MICA werden ULBPs auch auf zahlreichen Tumorzellen exprimiert.

Eine weitere aktivierende Gruppe von NCR auf NK-Zellen sind NKp30, NKp44 und NKp46, welche bei der Erkennung und Eliminierung von Viren und Tumorzellen eine Rolle spielen. Die Entdeckung von *exosomal proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), HLA-B assoziiertes Transkript-3 (BAT3) sowie Galektin-3 als Liganden für NKp44 bzw. NKp30 legen nahe, dass NCR als Rezeptoren für *damage-associated molecular pattern* (DAMPs) fungieren (Horton et al., 2015; Pogge et al., 2015).

Die dritte Gruppe der Ig-ähnlichen Rezeptoren bilden 14 KIR-Rezeptoren, die zwei (2D) oder drei (3D) extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen und entweder eine langen (*long*, L) oder kurzen (*short*, S) zytoplasmatischen Teil besitzen. 6 der KIR wie z.B. KIR2DS1 (CD158a, p50.1) und KIR2DS2 (CD158b, p50.2) sind aktivierende und die übrigen wie z.B. KIR2DL1 (CD158a, p58.1), KIR2DL2 (CD158b, p58.2) und KIR3DL1 (NKB1, p70) inhibierende Rezeptoren (Rajalingam 2012). Während CD158a und b an HLA-C Moleküle bindet, hat NKB1 eine Spezifität für HLA-Bw4. Eine einzelne Zelle kann parallel aktivierende und inhibitorische Rezeptoren exprimieren.

1.4 Toll-like Rezeptoren

Bisher werden beim Menschen 12 verschiedene TLR entdeckt, welche auf der Oberfläche oder intrazellulär auf der Membran von Endosomen lokalisiert sein können und der Erkennung von pathogenen Strukturen dienen (Hennessy et al., 2010). TLRs sind in der Lage distinkte Strukturen von verschiedenen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen zu erkennen. TLR regulieren über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder IRF (*Interferon Regulating Factor*) - 3 und -7 Gene für Zytokine, Chemokine und kostimulatorische Moleküle, die bei der Steuerung der angeborenen und erworbenen Immunabwehr eine Rolle spielen (Wesch et al., 2011).

TLR1 kann mit dem TLR2 ein Heterodimer bilden und erkennt triazylierte Lipopeptide, während TLR1 assoziiert mit TLR6 meist diazylierte Lipopeptide erkennt. TLR2 erkennt zusammen mit TLR1 und TLR6 eine große Vielfalt von PAMPs unter anderem Peptidoglykane, Lipoproteine und Lipopeptide von Gram-positiven Bakterien. TLR4 erfasst mit seinen extrazellulären Domänen MD-2 und CD14 Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin. TLR8 erkennt einzelsträngige RNA, welche während der Virusreplikation entsteht (Hennessy et al. 2010).

TLR9 erkennt deoxyzytidyl-phosphat-deoxyguanosine Motive (CpG) im Genom von Bakterien und Viren. Für TLR10 ist bislang kein Ligand identifiziert.

TLR11 erkennt uropathogene *E. coli*, während TLR11 sowie TLR12 Profilin von *T. gondii* bindet (Plattner et al., 2008; Koblansky et al., 2012).

1.4.1 TLR3 und TLR7

TLR3 und TLR7 erkennen aus Viren stammende Nukleinsäuren. TLR3 erkennt virale Doppelstrang (ds) RNA und das synthetische Analog Polyionosinsäure:Polycytidinsäure [poly(I:C)] und TLR7 erkennt Einzelstrang RNA oder synthetische Verbindungen wie Imidazoquinoline (Kawai et al., 2010).

Die Rezeptor-Ligand Interaktion führt zur Aktivierung der Signalkaskade über Toll-Interleukin 1 Rezeptor-Domänen-enhaltenden Adaptormolekülen (*TIR domain-containing adaptor molecules*). Es gibt fünf unterschiedliche TIRs: Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), *TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β* (TRIF/TICAM-1), *TIR-domain-containing adaptor protein/ MyD88-adaptor-like* (TIRAP/Mal), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und SARM (*Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*) (O'Neill et al., 2007). MyD88 kann von allen TLRs genutzt werden außer von TLR3, welches hauptsächlich TRIF rekrutiert (Jiang Z et al., 2004, Kawai et al., 2006). Nach Rekrutierung der Adaptermoleküle kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung intrazellulärer Kinasen wie z.B. der IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) und über weitere Phosphorylierungsschritte zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRF-3 und -7 sowie von MAP-Kinasen führt zur vermehren Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Typ I und Typ II Interferone (IFN), TNF- α und IL-6 sowie zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle (Alexopoulou et al., 2001; Kawai et al., 2010; Chang et al., 2010).

Im Unterschied zu den übrigen TLRs sind TLR3, TLR7, 8, 9 auf der Endosomen-Membran lokalisiert zu sein. Exprimiert wird TLR3 auf intestinalem Epithel, im Endometrium, auf Kreatinozyten, NK-Zellen, Fibroblasten, myeloiden BDCA-1⁺/CD11c⁺ dendritischen Zellen (DC) und auf $\gamma\delta$ T-Zellen (Wesch et al., 2006). Die TLR3-Ligand induzierte Typ-I IFN Produktion von myeloiden DC resultiert in einer indirekten Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten (Kunzmann et al., 2000). Zusätzlich zu der indirekten Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen über DC, konnte in unserer Arbeitsgruppe eine direkte Aktivierung von TLR3 exprimierenden $\gamma\delta$ T-Zellen über poly (I:C) gezeigt werden. Eine verstärkte CD69 Expression

und eine vermehrte IFN- γ Produktion konnte bei frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen nach poly (I:C) Stimulation in Kombination mit TZR-Aktivierung gezeigt werden (Wesch et al., 2006).

Im klinischen Einsatz erlangen die TLR Agonisten in der Behandlung von tumorösen Erkrankungen, allergischen Typ 1 Reaktionen und Infektionskrankheiten zunehmend an Bedeutung.

TLR7 und TLR8 sind konservierte Proteine, die in einigen Fällen die gleichen Liganden erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass humanes TLR7 Imiquimod und Resiquimod erkennt. Dies sind synthetische Verbindungen, welche vor allem klinisch in der Behandlung von virusassoziierten Genitalwarzen Verwendung und mittlerweile von Basaliomen, Aktinischer Keratosen oder bei malignen Lentigo Melanomen finden (Patel et al., 2007; Skinner 2004). Hier führen sie zu einer gesteigerten Immunantwort des kutanen Gewebes. Zusätzlich werden auch Loxoribine erkannt. Dies sind weitere synthetische Verbindungen, die antivirale und antitumoröse Eigenschaften aufweisen.

AladraTM (5% Imiquimod) wurde bereits von der Europäischen Union zur Behandlung von Basalzellkarzinomen zugelassen und erreicht Remissionen von bis zu 42-100% (Geisse et al., 2004; Love et al., 2009). Trotz der Erfolge in der topischen Behandlung ist die Rolle der TLR7/8 Agonisten in der systemischen Therapie nicht eindeutig erklärt. Neben den antitumorösen Eigenschaften kommen sie auch in der antiviralen Therapie zum Einsatz, und befinden sich in Phase II und III von klinischen Studien zur Behandlung von Hepatitis C und Herpes simplex Infektionen (Hemmi et al., 2002).

Weiterhin werden auch einige TLR3 Liganden für die klinische Anwendung entwickelt. Derivate des bekannten poly (I:C) befinden sich in klinischen Studien für solide Tumore. Rintatolimod wird sowohl in der Behandlung von Ovarial- und Eileiterkrebs als auch bei Hirntumoren eingesetzt. Zudem wird Rintatolimod zur Therapie des Erschöpfungssyndrom (Chronic Fatigue Syndrom, CFS), der Hepatitis B und C-Infektion und der HIV-Infektion eingesetzt (Jasani et al., 2009).

2 Fragestellung

Toll-like Rezeptor (TLR) Agonisten sind als Immunmodulatoren in der Tumorthherapie und als Adjuvanzen für Impfstoffe (Hepatitis, Desensibilisierung gegenüber Allergenen) zunehmend von klinischer Bedeutung. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte eine mögliche Modulation der $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität gegenüber verschiedenen Tumorzellen durch TLR-3 und -7 näher analysiert werden.

Folgende Punkte sollten in diesem Zusammenhang untersucht werden:

1. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Blut gesunder Spender und aus dem Blut bzw. der Aszitesflüssigkeit von Krebspatienten.
2. Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien von gesunden und krebskranken Spendern.
3. Phänotypische Charakterisierung der unterschiedlicher Tumorzellen (Pharynx-, Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinome).
4. Einfluss von TLR Agonisten poly(I:C) und Imiquimod bei der $\gamma\delta$ T- Zell abhängigen Lyse unterschiedlicher Tumorentitäten
5. Effekte der TLR3- und TLR7- Agonisten auf Zellüberleben- und Zelltod, die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine sowie die Modulation kostimulatorischer Moleküle.
6. Welche molekularen Mechanismen spielen bei der TLR-modulierten Lyse von Tumorzellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen eine Rolle?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medien

Zellkulturmedium mit 5% bzw. 10% Fötalem Kälberserum (FKS)

| | | |
|----------------------------|-----------|----------------------------|
| RPMI-1640 Fertigmedium mit | 500 ml | ThermoFisher, Karlsruhe |
| HEPES | 25 mM | |
| L-Glutamin | 2 mM | |
| Streptomycin | 100 µg/ml | Biochrom AG, Berlin |
| Penicillin | 100 U/ml | Biochrom AG, Berlin |

Einfriermedium

Zellkulturmedium mit 20% FKS

| | | |
|---------------------------|------------|------------------|
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | 10 % (v/v) | Merck, Darmstadt |
|---------------------------|------------|------------------|

3.1.2 Zytokine und Stimuli

| Substanz | Einsatzkonzentration | Bezugsquelle |
|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| Rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2) | 50 IE/ml | Chiron, Rating |
| Phytohämagglutinin A (PHA) | 0,5 µg/ml | Murex Biotech Ltd. (GB) |
| Bromhydrin-pyrophosphat (BrHPP) | 200 nM | Innate Pharma, Marseille |
| Isopentenyl-pyrophosphat (IPP) | 2 µg/ml | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Alendronat | 5 µM | MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar |
| Poly (I:C) | 50 µg/ml 25 µg/ml 12,5 µg/ml 10 µg/ml | Calbiochem, Schwalbach |
| Imiquimod - R&37 | 5 µg/ml 2,5µg/ml 1,25 µg/ml | Invivogen, Toulouse |

3.1.3 Antikörper

Antikörper für Durchflusszytometrie

| Monoklonale Antikörper | Klon | Konjugat | Klasse | Bezugsquelle |
|--------------------------------|----------|------------------|-------------------|---|
| Anti-HLA-I | W6/32-HL | unkonjugiert | IgG _{2a} | Hybridom ATCC |
| Anti-HLA-II | L243 | unkonjugiert | IgG _{2a} | Hybridom ATCC |
| Anti-human TZR- $\alpha\beta$ | BMA031 | -FITC -Biotin | IgG _{2b} | Invitrogen, ThermoFisher |
| Anti-human TZR- $\gamma\delta$ | 11F2 | -FITC -PE | IgG ₁ | Becton Dickinson (BD) Biosciences, HD |
| Anti-human V δ 1 | TS8.2 | -FITC | IgG ₁ | Endogen |
| Anti-human V δ 2 | Immu389 | -FITC | IgG ₁ | Immunotech |
| Anti-human V γ 9 | 7A5 | -FITC -Biotin | IgG ₁ | Eigenes Labor, Janssen et al., 1991 |
| Anti-human V γ 2/3/4 | 23D12 | -FITC | IgG ₁ | Eigenes Labor, Kabelitz et al., 1994 |
| Anti-human V γ 3/5 | 56.3 | -Botin | IgG ₁ | Eigenes Labor, Hinz et al., 1997 |
| Anti-human CD3 | SK1 | -FITC -PE | IgG ₁ | BD Biosciences |
| Anti-human CD4 | SK3 | -PE | IgG ₁ | BD Biosciences |
| Anti-human CD8 | OKT8 | Unkonjugiert | IgG ₁ | ATCC |
| Anti-CD11a | HI 111 | PE | IgG1 | Biologend |
| Anti-CD18 | 6-7 | FITC | IgG1 | BD Biosciences |
| Anti-CD54 | 84H10 | PE | IgG1 | BD Biosciences |
| Anti-human CD56 | MY31 | -FITC | IgG _{2b} | BDBiosciences |
| Anti-human CD80 | L307.4 | -PE | IgG ₁ | BDBiosciences |
| Anti-human CD86 | IT2.2 | unkonjugiert | IgG _{2b} | BD Biosciences |
| Anti-human ULBP-1 | 170818 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems, Wiesbaden |
| Anti-human ULBP-2 | 165903 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems |
| Anti-human ULBP-3 | 166510 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems |
| Anti-human MICA | AMO1 | unkonjugiert | IgG ₁ | Immatics, Tübingen |
| Anti-human MICA/B | 159207 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems |
| Anti-human MICB | 236511 | unkonjugiert | IgG _{2b} | R&D Systems |
| Anti-human NKG2D | 149810 | unkonjugiert | IgG ₁ | R&D Systems |
| Anti-human NKG2A | 131411 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems |
| Anti-human NKG2C | 134522 | unkonjugiert | IgG _{2b} | R&D Systems |
| Anti-human NKp30 | 210845 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems |

| Monoklonale Antikörper | Klon | Konjugat | Klasse | Bezugsquelle |
|------------------------|--------|-----------------|-------------------|----------------|
| Anti-human NKp46 | 195314 | unkonjugiert | IgG _{2a} | R&D Systems |
| Anti-CD158a | GL183 | PE | IgG1 | BD Biosciences |
| Anti-CD158b | EB6 | PE | IgG1 | BD Biosciences |
| Anti-NKB1 | DX9 | PE oder FITC | IgG1 | BD Biosciences |
| Anti-TLR3 | TLR3.7 | PE | IgG1 | e-Biosciences |
| Anti-TLR7 | 4F4 | unkonjugiert | IgG1 | Alexis |
| Anti-Granzym A | CB9 | PE | IgG1 | Biolegend |
| Anti-Granzym B | GB11 | Alexa Fluor 647 | IgG1 | BD Biosciences |

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC; entspricht Fluoreszenz 1) und Phycoerythrin (PE; entspricht Fluoreszenz 2) sind die beiden hauptsächlich verwendeten Farbstoffe, welche an die Antikörper gekoppelt waren. Wurden die beiden Konjugate im Durchflusszytometer mit einem Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, emittierte PE Licht bei 563-587 nm und FITC bei 520-540 nm. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß den Empfehlungen der Firmen bzw. mit einer vorher austitrierten Einsatzkonzentration von 10-40µg/ml eingesetzt.

Isotypkontrollen

| Antikörper | Klon | Konjugat | Klasse | Bezugsquelle |
|-----------------------------|----------|--------------|-------------------|----------------|
| Anti-Maus IgG ₁ | X40 | -PE -FITC | IgG ₁ | BD Biosciences |
| Anti-Maus IgG _{2a} | X39 | -PE -FITC | IgG _{2a} | BD Biosciences |
| Anti-Maus IgM | G155-228 | -FITC | IgM | BD Biosciences |

Sekundärreagenzien

| Reagenz | Konjugat | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|----------|--------------------------|
| Streptavidin | -PE | BD Biosciences |
| Ziege F(ab') ₂ -anti-Maus | -PE | Invitrogen, ThermoFisher |

Antikörper für Chrom –Freisetzungstest und Magnet-Aktivierter Zellsorter (MACS)

| Antikörper | Klon | Konjugat | Klasse | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|------------|--------------|------------------|------------------------------|
| Anti-human V γ 9 | 7A5 | unkonjugiert | IgG ₁ | Eigenes Labor |
| Anti-human TCR pan $\gamma\delta$ | 11F2 | unkonjugiert | | C. Morita |
| Anti-human TCR pan $\gamma\delta$ | Immu 510 | unkonjugiert | IgG ₁ | Immunotech Monrovia (USA) |
| Anti-human NKG2D | M585 | unkonjugiert | IgG ₁ | Amgen, München |
| Maus IgG | Polyphanol | unkonjugiert | | Sigma |

3.1.4 Puffer und Lösungen

Substanzen für Zytotoxizitätstest

| | |
|---------------------------|---|
| Chromium ⁵¹ | HARTMANN ANALYTIC, Braunschweig, Deutschland |
| Triton X-100 Lösung (10%) | Merck, Darmstadt |
| Aqua dest. | |

Eosinlösung für Zellzahlbestimmung (500ml)

| | | |
|------------------|--------|--------------------------|
| Eosin | 2 g | Serva, Heidelberg |
| NaN ₃ | 0,25 g | Serva |
| NaCl-Lösung 0,9% | 450 ml | Merck, Darmstadt |
| FKS | 50 ml | Invitrogen, ThermoFisher |

Ficoll-Trennlösung

| | | |
|--------------------------|------------|---------------------|
| Bicoll Separationslösung | 1,077 g/ml | Biochrom AG, Berlin |
|--------------------------|------------|---------------------|

Puffer für Immunfluoreszenz

| | | |
|-----------------------|----------------|----------------------|
| Paraformaldehyd (PFA) | 1% (w/v) | Sigma, Taufkirchen |
| PBS | Fertiglösung | CellConcept, Umkirch |
| Propidiumjodid (PI) | 2,5 μ g/ml | Serva |

Antikoagulanzen

| | | |
|------------------|---------------------------------|------------------|
| Heparin/ Natrium | 1 ml/ 100 ml Blut 5000 IE/ml | Braun, Melsungen |
|------------------|---------------------------------|------------------|

MACS Waschpuffer

| | | |
|------------|------------|--------------------|
| PBS pH 7,2 | | |
| BSA | 0,5% (w/v) | Sigma, Taufkirchen |
| EDTA | 2 mM | Merck, Darmstadt |

PBS für Zellkultur

| | | |
|-----|--------------|----------------------|
| PBS | Fertiglösung | CellConcept, Umkirch |
|-----|--------------|----------------------|

Trypsin-Lösung Fertiglösung

| | | |
|---------|------------|---------------------|
| Trypsin | 0,5% (v/v) | Biochrom AG, Berlin |
| EDTA | 0,2% (v/v) | Merck, Darmstadt |

Waschpuffer für Immunfluoreszenz

| | | |
|------------------|--------------|----------------------|
| BSA | 1% (w/v) | Serva, Heidelberg |
| NaN ₃ | 0,1% (w/v) | Serva, Heidelberg |
| PBS | Fertiglösung | CellConcept, Umkirch |

3.1.5 Test-Kits

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| MACS FcR-Blockingreagenz | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| MACS TCR $\gamma\delta$ Kit | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| MACS <i>goat-anti-mouse (gam)</i> Kit | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| MACS SA Kit | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| IFN- β ELISA (# 41105) | PBL Biomedical Laboratories |
| IFN- α ELISA (# 41410) | PBL Biomedical Laboratories |
| Granzym A ELISA (# BMS2026) | BenderMedSystems |
| Granzym B ELISA (# BMS2027) | BenderMedSystems |
| IL-6, TNF- α | Immunlite DPC Biermann |

3.1.6 Membranen und Filter

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Sterifilter Steritop 0,22 μ m | Millipore, Schwalbach |
| Pre-Seperationsfilter | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

| | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| Abdeckplatten | Greiner, Frickenhausen |
| Färbepplatten 96-well (Spitzboden) | Nerbe Plus, Winsen/Luhe |
| Falcon-Röhrchen 2054 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Kryoröhrchen (Einfrierröhrchen) | Nunc, Wiesbaden |
| Latexhandschuhe | Ansell GmbH, München |
| LumaPlate™-96 (flache Kavitäten) | PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim |
| MACS-LS-Säulen | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| MACS-LD-Säulen | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| Pasteurpipetten ungestopft | Assistent, Sondenheim |
| Pasteurpipetten gestopft | Assistent, Sondenheim |
| Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Röhrchen (15ml; 50 ml) | Greiner, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellkulturflaschen 50 ml | Greiner, Frickenhausen |
| Zellkulturflaschen 250 ml | Greiner, Frickenhausen |

| | |
|---|------------------------|
| Zellkulturflaschen 650 ml | Greiner, Frickenhausen |
| Zellkulturplatten (6-well; 24-well) | Greiner, Frickenhausen |
| Zellkulturplatten (96-well ,Rund- und Flachboden) | Nunc, Wiesbaden |

3.1.8 Geräte

| | |
|--|--------------------------------|
| Bestrahlungsgerät (Gammacell40) | Atomic energy of Canada Ltd. |
| Biofuge | Heraeus, Kendro, Hanau |
| CO ₂ -Begasungsbrutschrank Typ HeraCell 240 | Heraeus, Kendro, Hanau |
| Durchflusszytometer (FACSscalibur) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ein- und Zwölfkanalpipetten | Eppendorf, Hamburg |
| ELISA-Reader Sunrise | Tecan, Crailsheim |
| Kühlzentrifuge Typ 15R | Heraeus, Kendro, Hanau |
| Kühlzentrifuge Typ Multifuge 3 S-R | Heraeus, Kendro, Hanau |
| Lichtmikroskop | Zeiss, Jena |
| Magnet-aktivierter Zellsorter (MACS) | Miltenyi, Bergisch-Gladbach |
| MicroBeta TriLux | PerkinElmer, Rodgau Jügesheim |
| Neubauer Zählkammer | Roth, Karlsruhe |
| Pipetus | IntergraBiosciences, Chur (CH) |
| Sterilbank | Heraeus, Kendro, Hanau |
| Tischzentrifuge Typ 5415C | Eppendorf, Hamburg |
| Wärmeschrank | Heraeus, Kendro, Hanau |
| Wasserbad | GFL, Großburgwedel |
| Invertoskop | |
| Zentrifuge Typ Megafuge 1.0 | Heraeus, Kendro, Hanau |

3.2 Methoden

3.2.1 Ethikvotum

Das Forschungsprojekt wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel und des Universitätsklinikums Tübingen (Referenznummer: A135/01) genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten eingeholt.

3.2.2 Zelllinien

Generierung von T-Zelllinien

Ein Teil der verwendeten $\gamma\delta$ T Zelllinien von gesunden Spendern wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMZ) isoliert. Weitere Linien wurden aus Patientenblut und Aszites generiert. Hierzu wurden die Ficoll-Hypaque-separierten PBMZ der Spender mit BrHPP und IL-2 stimuliert, selektiv expandiert und

anschließend mit magnetaktiviertem Zellsorter (MACS) von kontaminierten $\alpha\beta$ T-Zellen gereinigt.

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfhaltigen Umgebung nach Bestimmung der Zellzahl in Zellkulturmedien (RPMI-Medium mit 10% fötales Kälberserum (FKS), 100µg/ml Streptomycins, 100 IE/ml Penicillin) und 50 IE/ml Interleukin-2 kultiviert.

Im zwei bis dreitägigem Abstand wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versorgt, und für die Aufrechterhaltung der Proliferation wurden diese T-Zelllinien ca. alle zwei Wochen mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) in Anwesenheit mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und bestrahlter Epstein-Barr Virus (EBV)-transfizierter B-Zellen stimuliert.

Zuvor wurden die PBMZ und EBV-transfizierten Zellen mit 40 bzw. 60 Gray bestrahlt, um deren Wachstum zu unterbinden. Die Zusammensetzung des sogenannten *feeder*-Cocktails sah folgendermaßen aus: auf 1*10⁶ Zielzellen wurden je 1*10⁶ bestrahlte PBMZ, 1*10⁵ bestrahlte EBV-transfizierte B-Zellen und 0,5 µg/ml PHA gegeben.

Auch die ehemals im Labor mit Grenzverdünnungsanalyse etablierten $\gamma\delta$ T-Zellklone, die in vorliegender Arbeit Verwendung fanden, wurden alle 14 Tage mit einem *feeder*-Cocktails stimuliert.

3.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation lassen sich PBMZ aus Vollblut oder Buffy Coat (Lymphozytenkonzentrat) isolieren. Dazu wird das Vollblut oder der Buffy Coat mit PBS verdünnt, über Ficoll geschichtet und abzentrifugiert. Aufgrund der genau eingestellten Ficoll-Dichte von 1,077 g/ml entsteht eine Phasengrenze, an dem sich die mononukleären Zellen sammeln, während sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen aufgrund ihrer höheren Dichte als Sediment absetzen. Die Monozyten und Lymphozyten bilden den Interphasenring.

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wird der Buffy Coat 1:1 mit PBS verdünnt. Von dieser Suspension werden 30 ml auf 15 ml Ficoll geschichtet und anschließend 20 min bei 2000 rpm (Megafuge 1.0) ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wird der Interphasenring abgenommen und dreimal gewaschen, um Thrombozyten und Rückstände des Ficolls zu entfernen. Zur Beseitigung der Ficoll-Rückstände wird der Interphasenring einmal bei 1600 rpm 5 min und zur Minimierung der Thrombozyten zweimal bei 1000 rpm 10 min mit PBS gewaschen. Dabei wird nach jeder Zentrifugation der Überstand verworfen. Die gereinigten

Zellen werden gezählt und gleichzeitig auf ihre Vitalität überprüft und schließlich in Zellkulturmedium aufgenommen.

3.2.4 Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien aus Aszites

Der Aszites aus der I. Medizin bzw. der Gynäkologie (11) wurde auf 50 ml Röhrchen verteilt und anschließend bei 1600 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10% FCS Zellkulturmedium aufgenommen, gezählt und über Ficoll gegeben. Nach der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Zellen zweimal gewaschen, gezählt und im Einfrierröhrchen ($15-20 * 10^6$ Zellen) eingefroren bzw. ein Teil davon mit BrHPP + IL-2 stimuliert, um die Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen zu propagieren.

Wir danken an dieser Stelle Prof. Mundhenke und Frank Rösel für die zur Verfügung Stellung des Aszites.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl und ihrer Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wird die zu kultivierende Zellsuspension in Eosin aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer mit definiertem Kammervolumen bestimmt. Dazu werden mindestens zwei Eckquadrate ausgezählt. Gleichzeitig erhält man Informationen über den Zustand der Zellen. Zellen, bei welchen durch die Membranläsion Eosin ins Zellinnere gelangt und zur Anfärbung der Zellen führt, werden nicht mitgezählt.

Die Zellkonzentration lässt sich dann mittels Division durch die gezählten Eckquadrate und Multiplikation mit dem Kammerfaktor (10^4) und dem Verdünnungsfaktor errechnen.

3.2.6 Kryokonservierung von Zellen

Lebende Zellen können in Kulturmedium unter Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Kristallbildung beim Einfrieren unterbindet, auf lange Zeit in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Die entsprechenden Zellen wurden für 5 min bei 1300rpm (Megafuge 1.0) abzentrifugiert und mit einer maximalen Zellzahl von $30*10^6$ (T-Zellen) bzw. $5*10^6$ (Tumorzellen) pro ml in gekühltem Einfriermedium aufgenommen. In Kryoröhrchen wurden die Zellen bei -70°C über Nacht zwischengelagert, bevor sie dann in -196°C kalten Stickstoff gebracht wurden. Zum Auftauen der Zellen wurden diese ohne Verzögerung bei 37°C aufgetaut und in 10% Zellkulturmedium überführt und gleich zentrifugiert. Anschließendes zweimaliges Waschen der Zellen bei 1300rpm für 5 min gewährleistete die

vollständige Beseitigung des bei Raumtemperatur toxisch wirkenden DMSO. Die aufgetauten Zellen wurden mikroskopisch auf ihre Vitalität überprüft und gezählt.

3.2.7 Zellseparation mit dem Magnet-aktivierten Zellsorter (MACS)

Zur Selektion von Lymphozytenpopulationen wurden die zu anreichenden Zellen als erstes mit spezifischen Antikörpern (AK) gegen die gewünschten Oberflächenantigene markiert. Im zweiten Schritt wurden Mikromagnetpartikel, welche mit Streptavidin, Ziege-anti-Maus Ak oder FITC konjugiertem anti-Hapten Ak beschichtet sind, zugegeben. Durch diese Arbeitsschritte wurden die mit Mikromagnetpartikeln behafteten Zellen in der magnetischen Säule zurückgehalten (positive Selektion), während alle anderen Zellen die Säule durchlaufen und aufgefangen wurden (negative Selektion). Über einen Elutionsschritt konnten dann, nach Entfernung der Säulen aus dem Magnetfeld die verbliebenen Zellen gewonnen werden. Die verwendeten Antikörper für die Separationen werden in Isolationskits mitgeliefert.

Positive Selektion von $\gamma\delta$ T-Zellen

Hiermit ist es möglich $\gamma\delta$ T-Zellen, welche zu Beginn mit anderen Zellen kontaminiert waren, durch positive Selektionen auf eine Reinheit von über 99% zu bringen.

Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1,2 ml MACS-Waschpuffer aufgenommen und anschließend mit 300 μ l *Blocking*-Reagenz für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (+ 20 ml MACS-Waschpuffer; 1300 rpm, 5 min) erfolgte eine Inkubation der in 1,3 ml MACS-Waschpuffer aufgenommenen Zellsuspension mit 300 μ l anti-TZR $\gamma\delta$ -Hapten Antikörper (Ak) für 10 min bei 4°C. Nach dem Waschen gab man im nächsten Schritt 900 μ l Waschpuffer und anti-Hapten-Mikromagnetpartikel (FITC konjugiert) zu und ließ die Suspension für 15 min bei 4°C im Kühlschrank inkubieren. Nach einem weiteren Waschschrift (+ 15 ml MACS-Waschpuffer; 1300 rpm, 5 min) wurde anhand eines Pre-Separationsfilter, welcher Zellaggregate aufhält, die Zellsuspension auf eine LS-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 3 ml MACS-Waschpuffer gewaschen und der Durchlauf verworfen. Die $\gamma\delta$ T-Zellfraktion eluierte man nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld mit 5 ml Waschpuffer. Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Kulturmedium mit 10% FKS und IL-2 (50 IE/ml) aufgenommen, gezählt und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit überprüft.

Depletion von kontaminierten $\alpha\beta$ T-Zellen aus $\gamma\delta$ T-Zelllinien

Für die Trennung dieser beiden T-Zelllinien, wurden diese bei 1300 rpm für 5 min abzentrifugiert und in 600 μ l MACS Waschpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 10 μ l biotinyliertem anti-TZR $\alpha\beta$ mAk (BMA031-Biotin, 25 μ g/ml) für 25 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (+ 20 ml MACS-Waschpuffer; 1300 rpm, 5 min) wurden 150 μ l Ziege-anti-Maus Mikromagnetpartikel (binden an Maus-anti-human mAk) oder 10 μ l Streptavidin-Mikromagnetpartikel (binden an Biotin) zugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 20 ml MACS-Waschpuffer bei 1300 rpm für 5 min gewaschen, in 1 ml MACS-Waschpuffer aufgenommen und auf eine LS-Säule gegeben. Der Durchlauf mit den $\gamma\delta$ T-Zellen wurde aufgefangen. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit untersucht. Lag die Reinheit unter 95% , wurde die Depletion von $\alpha\beta$ T-Zellen wiederholt.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann die Expression zellulärer Oberflächenantigene im Durchflusszytometer bestimmt werden. Hierbei wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern markiert. Die Größe der Zellen kann durch die in 180° gerichtete Lichtstreuung im Vorwärtsscatter (FCS), die Granularität der Zellen durch die in 90° gerichtete Lichtstreuung im Seitwärtsscatter (SSC) bestimmt werden. Die zellgebundenen fluoreszierenden Antikörper werden durch Laserimpulse angeregt. Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC = Fluoreszenz 1) und Phycoerythrin-(PE = Fluoreszenz 2) Konjugate werden durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Emissionsmaxima der einzelnen Farbstoffe (FITC= 525; PE= 575 nm) liegen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen und können von entsprechenden Detektoren registriert und differenziert werden. Rechnerisch können die Signale überlappender Emissionsbereiche gegeneinander kompensiert werden. Da Zellen eine geringe Autofluoreszenz aufweisen können, wurde bei jeder Färbung eine Kontrolle mit Isotyp-Antikörpern mitgeführt.

Einfach- und Zweifachfärbung von Zelloberflächenantigenen

Die Oberflächenmarkierung wurde mit $1-5 \cdot 10^5$ der entsprechenden Zellen in Spitzbodenplatten mit 96 Kavitäten durchgeführt. Die Zellen wurden bei 4°C für 4 min und 1000 rpm (Multifuge 3 S-R) abzentrifugiert und zweimal mit 150 μ l Waschpuffer für Immunfluoreszenz gewaschen. Nach Entfernung des Waschpuffers wurden die Zellen durch

Rütteln in der Spitzbodenplatte aufgelockert und anschließend in 5-10 µl der Antikörpersuspension resuspendiert und für 25 Minuten inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die direkt mit FITC- oder PE-markierten Zellen in 100 µl 1%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert. Bei biotinylierten Primärantikörpern wurden im zweiten Schritt PE-konjugiertes Streptavidin hinzugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen und in 100 µl 1%iger PFA-Lösung aufgenommen. Die fixierten Zellen wurden im Durchflusszytometer (FACScalibur) gemessen und unter Verwendung der CellQuest-oder WinMDI-Software ausgewertet.

Intrazelluläre Markierung (kombiniert mit Oberflächenmarkierung)

Hierbei wurden $1-5 \times 10^5$ Zellen in einer Vertiefung einer 96 Spitzbodenplatte gegeben, einmal mit 200 µl Staining-Puffer bei 1100 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min gewaschen und mit 7 µl von dem jeweiligen Antikörper für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das entstandene Zellpellet durch einen Rüttler aufgelockert, mit 100 µl Fix-Perm Puffer resuspendiert und für eine Stunde im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte bei 1100 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen einmal mit 200 µl Staining Puffer bei 1100 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min gewaschen und zweimal mit 200 µl Permeabilisation Puffer bei 11000 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde das Zellpellet anschließend mit 20 µl Blockierungslösung für 15 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden je 5 µl Antikörper (z.B. anti-TLR Ak bzw. anti-Granzym A oder B Ak) hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Permeabilisation Puffer bei 1100 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen, am Durchflusszytometer gemessen und mit der CellQuest Pro Software analysiert.

Zelltod-Markierungen

Durch Propidiumjodid (PJ) lässt sich Zelltod im Durchflusszytometer quantifizieren. Dabei gelangt das PJ aufgrund von Membranläsionen in tote Zellen und interkaliert in die DNS der Zelle. In dieser interkalierten Form hat PJ ein Emissionsspektrum zwischen 560 und 615 nm und kann mittels Fluoreszenz 2 oder Fluoreszenz 3 detektiert werden. Angeregt wird es durch Licht der Wellenlänge 488 nm, welches im Durchflusszytometer die Unterscheidung toter von lebenden Zellen zulässt.

Annexin-V ist ein Calcium abhängiges Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen Zellen von der Membranninnenseite zur Außenseite transloziert. Annexin-V kann daher für die Phosphatidylserin-Exposition auf der Membranaußenseite aller apoptotischen Zellen eingesetzt werden. In Kombination mit PJ können apoptotische Zellen (Annexin⁺ PJ) und nekrotische Zellen (Annexin-V⁺ PJ⁺) unterschieden werden. Durch den Verlust der Membranintegrität binden Annexin als auch PJ an nekrotische Zellen.

Jeweils $1-5 \cdot 10^6$ Zellen wurden für 4 min und 1000rpm (Multifuge 3S-R) abzentrifugiert und einmal mit 150 μ l Waschpuffer (4 min, 4°C, 1000 rpm, Multifuge3S-R) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ l Annexin-V-FITC (1-10 μ g/ml) und 100 μ l Propidiumjodid-haltigem PBS (2,5 μ g/ml) aufgenommen, 10 Minuten inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Annexin-V-FITC wird ebenfalls bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und mit einem 515 nm Bandpass Filter für Fluorescein detektiert.

3.2.9 ⁵¹Chromium-Freisetzungstest

Der Chromium-Freisetzungstest dient der Erfassung der Lyse von Zielzellen durch T-Zellen. Dabei werden die Zielzellen (Targets) mit radioaktivem ⁵¹Chrom (ein Gamma-Strahler) für eine Stunde markiert und nehmen dieses auf. Als nächstes werden die Zielzellen gewaschen und zu den Effektorzellen gegeben. Die Lyse der Zielzellen durch die Effektoren verursacht die Freisetzung von ⁵¹Chrom und kann aufgrund der radioaktiven Emission im Überstand mit einem Counter gemessen werden. Die Effektivität der Lyse lässt sich prozentual berechnen.

Im Detail wurden $5 \cdot 10^5$ Tumorzellen in 500 μ l RPMI Kulturmedium mit 10% FKS aufgenommen und mit 50 μ Ci ⁵¹Chrom für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und dreimal mit 5 ml RPMI Kulturmedium 5% FKS (5 min, 1300 rpm) gewaschen und anschließend in 12 ml Medium aufgenommen. In der Inkubationszeit der Tumorzellen wurden die Effektorzellen als Verdünnungsreihe in Dreifachwerten in einer 96-well-Rundbodenplatte je 50 μ l ausgesät. Zusätzlich wurden bei einigen Experimenten verschiedene Substanzen, welche sowohl aktivierende als auch inhibierende Eigenschaften besaßen, je 50 μ l dazugegeben. Die mit ⁵¹Chrom vorbehandelten Zielzellen, welche teilweise mit TLR-Liganden und dem Aminobisphosphonat Alendronat für 20h vorinkubiert waren, wurden je 50 μ l (2000/well) zu den Effektorzellen pipettiert. Hierbei betragen die absteigenden Konzentrationen der Effektor- gegenüber den Zielzellen 100:1 - 50:1 – 25:1 – 12,5:1.

Für die Berechnung der prozentualen Lyse behelf man sich der Spontanlyse und der Maximallyse. Bei der Spontanlyse wurden zu zwei Dreierwerten der Zielzellen statt Effektorzellen 50µl Medium pipettiert und bei der Maximallyse gab man statt Medium eine 10%ige Lösung Triton X-100 hinzu. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden pro Kavität 80µl Überstand entnommen und über Nacht in szintillatorbeschichteten 96-well Platten (LumaPlate™, Perkin Elmer) getrocknet. Die enthaltene radioaktive Strahlung wurde in einem Radioaktivitätsmessgerät (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer) gemessen.

Folgende Formel wurde zur Berechnung der prozentualen Lyse eingesetzt:

$$\text{Prozentuale Lyse: } 100 \cdot \frac{(\text{gemessene Lyse} - \text{Spontanlyse})}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}}$$

Folgende Substanzen wurden im Zytotoxizitätstest eingesetzt

| | |
|----------------|----------|
| Maus IgG | 10 µg/ml |
| NKG2D mAk M585 | 10 µg/ml |
| Vγ9 mAk 7A5 | 10 µg/ml |
| Alendronat | 5µM |
| Imiquimod | 5 µg/ml |
| Poly (I:C) | 50 µg/ml |

3.2.10 Enzymgekoppelte immunchemische Analyse (ELISA)

Beim ELISA wurde der Zellkulturüberstand, in welchem man Zytokine bestimmen wollte, auf eine Zellkulturplatte gegeben, an welcher gegen das gewünschte Protein gerichteter Antikörper gebunden war. Anschließend wurde ein zweiter, gegen das Protein gerichteter Antikörper gekoppelt mit einem Enzym hinzugegeben. Dies bewirkt eine Umwandlung der Substratlösung in einen Farbstoff. So konnte durch den Vergleich der Farbintensität mit einer Standardreihe die Konzentration des gesuchten Proteins im ELISA-Reader bestimmt werden. Die verwendeten ELIA-Kits sind im Materialteil bereits aufgeführt.

Tumorzellen

Die Tumorzellen werden in Kulturflaschen (50 ml, 250 ml, 650 ml) aufbewahrt und je nach Spezifität versorgt. Dabei spielen Herkunft und Wachstumsgeschwindigkeit in der Kultivierung eine große Rolle.

Das Medium wurde zwei bis dreitagig gewechselt. Die adhärent wachsenden Tumorzellen wurden dabei mit Trypsin/EDTA –Lösung 15-30 Minuten (je nach Zelllinie) bei 37°C gelöst und die Kulturflaschen mit PBS ausgespült. Anschließend zentrifugiert man die Suspension für 5 min bei 1300 rpm. Ein Teil des Tumorzell-Pellets wurden dann im frischen Medium aufgenommen und wieder ausgesät.

Die Tumorzellen wurden freundlicherweise von den erstgenannten Personen in der Spalte „Ursprung“ der folgenden Tabelle zur Verfügung gestellt. Besonderer Dank für die Bereitstellung gilt in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Dr. F. Gieseler aus der 1. Medizin des UK S-H Campus Kiel, Frau Prof. Dr. M. Zöller aus Heidelberg und Herrn Prof. Dr. Kalthoff, Molekulare Onkologie des UK S-H Campus Kiel. Der Genotyp der vorhandenen Zellen wird regelmäßig mit *Short Tandem Repeat Analysis* durchgeführt.

| Verwendete Tumorzellen | Tumorart | Ursprung | Medium |
|------------------------|---|---|---|
| MeWo | Malignes Melanom Lymphknotenmetastase | M. Zöller, Heidelberg; Carey et al., 1976 | RPMI-Medium mit 10% FKS |
| Lung-Ca 459 | Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom | F. Gieseler, Kiel Virmani et al., 1998 | RPMI-Medium mit 10% FKS |
| PancTu-I | Pankreasadenokarzinom Primartmor | H. Kalthoff, Kiel Morgan et al., 2001 | RPMI-Medium mit 10% FKS |
| Colo357 | Adenosquamöses Pankreaskarzinom Lymphknotenmetastase | H. Kalthoff, Kiel Morgan et al., 1980 | RPMI-Medium mit 10% FKS |
| PCI-1 | Hypopharynxkarzinom | B.Wollenberg, Lübeck; Pittsburgh Cancer Institute | DMEM-Medium mit 10% FCS, 1mM Glutamin und 0.1mM Natrium Pyruvat |

| Verwendete Tumorzellen | Tumorart | Ursprung | Medium |
|-------------------------------|------------------------------------|--|---|
| BHY | Human oral squamous cell carcinoma | B.Wollenberg, Lübeck; Dr. Kawamata, Tokushima University, Japan | DMEM-Medium mit 10% FCS, 1mM Glutamin und 0.1mM Natrium Pyruvat |
| PT45P1 | Ductales Pankreasadenokarzinom | H. Kalthoff, Kiel Morgan et al., 1980 | RPMI-Medium mit 10% FKS |
| Panc 89 | Ductales Pankreasadenokarzinom | H. Kalthoff, Kiel Morgan et al., 1980 | RPMI-Medium mit 10% FKS |

4 Ergebnisse

4.1 Unterschiedliche Aktivierbarkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem im peripheren Blut und aus Aszites von Tumorpatienten

Der Einsatz von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Immuntherapie ist von großem Interesse und hat bereits einige Teilerfolge in diversen klinischen Studien erzielt (Dieli et al., 2007; Caccamo et al., 2008; Burjanadze et al., 2007; Viey et al., 2008; Bennouna et al., 2008; Bouet-Toussaint et al., 2008).

In vorliegender Doktorarbeit stellte sich u.a. die Frage, ob $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in Tumorpatienten durch eine möglicherweise permanente Aktivierung erschöpft sind. Eine Erschöpfung könnte die von anderen Gruppen beobachtete Einschränkung ihrer Effektorfunktion möglicherweise erklären (Dieli et al., 2007).

Es wurde daher der Prozentsatz an T-Lymphozyten mit Fokus auf die $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut und im Aszites von Krebspatienten (Ovarial-, Mamma- und Pankreaskarzinomen) und deren Proliferationskapazität ermittelt.

Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass der relative Anteil der CD3 positiven TCR $\alpha\beta$ T-Zellen im Aszites geringfügig höher lag als im peripheren Blut (Abb. 1A). Der relative Prozentsatz der CD3-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen wiederum war im Aszites der Krebspatienten niedriger als im Blut gesunder Spender und Krebspatienten (Abb. 1A).

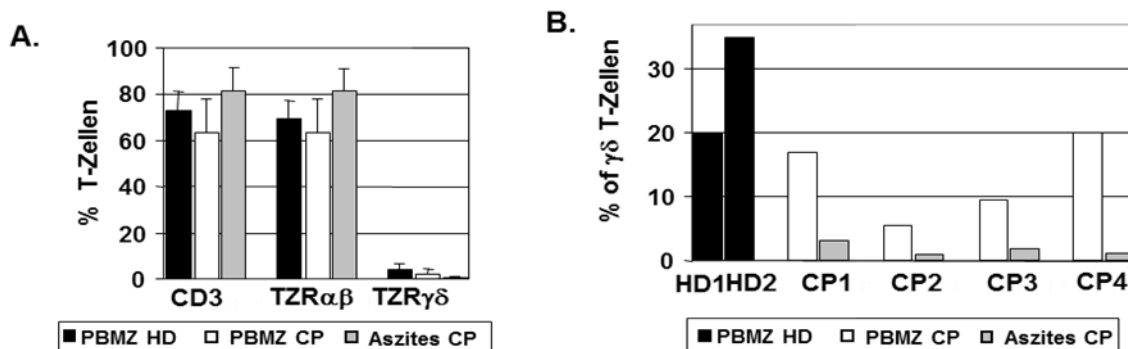


Abbildung 1. Das relative Verhältnis und die Aktivierbarkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut und im Aszites.

(A) Der relative Anteil von CD3-, TCR $\alpha\beta$ - und TCR $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der PBMZ gesunder Spender (HD = *Healthy Donors*) und Tumorpatienten (CP = *Cancer Patients*) sowie aus dem Aszites der Tumorpatienten wurde welcher mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Balken stellen die Mittelwerte von 6 gesunden Spendern und 4 Krebspatienten (2x Ovarial, Mamma bzw. Pankreaskarzinom) dar. (B) Ein Teil der in Abb. 1A dargestellten Spender-PBMZ (2 repräsentative gesunde Spender = HD 1, 2 und 4 Krebspatienten, CP1-4) wurden mit 200 nmol/L BrHPP in Anwesenheit von 50 Units/ml IL-2 stimuliert. Der relative Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde nach 9 Tagen Zellkultur durch Anfärben mit anti-TCR $\gamma\delta$ mAk durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Mehrzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl im Blut als auch im Aszites exprimierten V γ 9V δ 2 (Daten nicht gezeigt). V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen lassen sich nach Stimulation mit PAg wie z.B. BrHPP selektiv um ein vielfaches expandieren. Der Versuch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus dem Aszites von Krebspatienten zu expandieren schlug fehl (Abb. 1B, graue Balken). Zum Vergleich wurden die PBMZ der gleichen Spender (Abb. 1B, weiße Balken) oder PBMZ von gesunden Spendern mit einer relativ niedrigen Ausgangszellzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen (< 1%) verwendet (Abb. 1B, schwarze Balken). Die $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der PBMZ proliferierten deutlich stärker als die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus dem Aszites (Abb. 1B). Allerdings ließ sich auch eine etwas verminderte $\gamma\delta$ T-Zellproliferation innerhalb der PBMZ von Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Spendern ermitteln (Abb. 1B).

Durch eine Depletion der CD4- und CD25- positiven regulatorischen T-Zellen konnte keine verbesserte $\gamma\delta$ T-Zellproliferation erreicht werden. Im Gegensatz dazu proliferierten die $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut derselben Probanden nach Depletion der regulatorischen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten deutlich stärker (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der aufgeführten Spender ist sehr gering. Vergleichbare Ergebnisse lieferten jedoch weitere parallele Untersuchungen in der Gruppe (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der zytotoxischen Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Blut von Krebspatienten wurden von diesen Patienten $\gamma\delta$ T-Zelllinien angelegt und gegen Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten getestet. Die Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien aus Aszites gelang auf Grund der schlechten Aktivierung der Zellen nicht. Als Kontrolle dienten $\gamma\delta$ T-Zelllinien bzw. Klone von gesunden Spendern. Zudem wurde überprüft inwiefern die Gabe von TLR Agonisten die Zytotoxizität verbessert und dadurch die „Erschöpfung“ der $\gamma\delta$ T-Zellen umgangen oder vermindert werden kann.

4.2 Der Einfluss von TLR Agonisten poly(I:C) und Imiquimod bei der $\gamma\delta$ T-Zell abhängigen Tumorlyse verschiedener Tumorarten

Toll-like Rezeptoren erkennen bestimmte molekulare bakterielle oder virale Strukturen. TLR werden sowohl von Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Ferner bietet die Aktivierung der TLR über ihre Liganden bzw. über synthetische Agonisten eine gute Möglichkeit die Immunantwort zu modulieren (Hennessy et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf TLR3 und TLR7, da es bereits Hinweise aus der Literatur gab, dass die TLR auch auf

Tumorzellen exprimiert werden und die anti-Tumorantwort dadurch moduliert werden kann (Pries et al., 2008; Smits et al., 2008).

Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs wie z.B. duktale Pankreasadenokarzinome (PT45P1, Panc89, PancTu-I, Colo357), Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (PCI-1, BHY), ein Lungenkarzinom (Lungen-Ca 459), Ovarialkarzinome (selbst etabliert) und ein Malignes Melanom (MeWo) wurden durchflusszytometrisch auf TLR3 und TLR7 Expression hin untersucht. Wie in Abbildung 2A dargestellt, exprimierten alle getesteten Karzinome intrazellulär TLR3, ausgenommen das Maligne Melanom MeWo. Die Ovarialkarzinome exprimierten ebenfalls TLR3 (nicht gezeigt), sie konnten jedoch für die folgenden Zytotoxizitätsanalysen nur bedingt verwendet werden, da ⁵¹Chrom durch diese Tumorzellen sehr schlecht aufgenommen wurde. Erwartungsgemäß zeigte das Plattenepithelkarzinom des Pharynx BHY die höchste intrazelluläre TLR3 Expression (Pries et al., 2008). Zudem konnte bestätigt werden, dass TLR3 nicht auf der Zelloberfläche der untersuchten Tumorzellen exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Alle Zelllinien exprimierten zudem mit nahezu gleicher Intensität intrazellulär TLR7 (Abb. 2B). Als Kontrollen wurden Antikörper des gleichen Isotyps verwendet, die nicht an humane Zellen binden. Die Ergebnisse konnten in vier unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

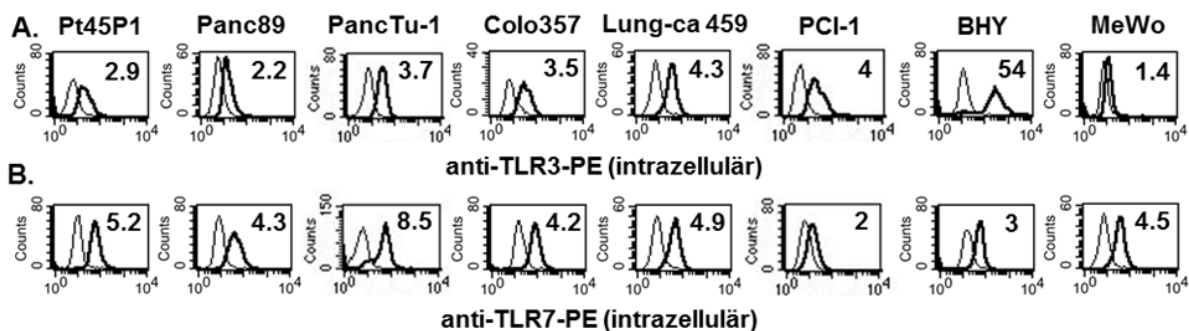


Abbildung 2. TLR3 und -7 Expression auf unterschiedlichen Tumorzellen.

Die intrazelluläre Expression von TLR3 (A) und TLR7 (B) wurde in einem Durchflusszytometer mit dem angegebenen Antikörper nach 30-minütiger Inkubation bestimmt. Dabei stellen die dünnen Linien die Isotypkontrolle dar, während die dicken Linien die Expression von TLR 3 und -7 darstellen. Im Unterschied zu den MeWo-Zellen, war die intrazelluläre Expression von TLR3 in den übrigen Tumorzellen sehr deutlich. Währenddessen exprimierten alle verwendeten Tumorzellen intrazellulär TLR7. Ein Histogramm ist repräsentativ für vier Wiederholungen. Zum besseren Vergleich der Färbungen untereinander wurde die mediane Fluoreszenzintensität (dargestellte Zahlen) berechnet. Diese errechnete sich als relative Erhöhung zu der jeweiligen Isotypkontrolle.

Anschließend wurde in Zytotoxizitätsanalysen die Lyse der Tumorzellen durch $\gamma\delta$ T-Effektorzellen überprüft. Die direkte Zugabe des TLR3- bzw. TLR7 Liganden poly(I:C) bzw. Imiquimod führte weder zu einer Steigerung der Lyse bei den gesunden Spendern (GS1-GS4) noch bei den Krebspatienten (KP1-KP2). Diese Resultate konnten in zwei bis vier unabhängigen Experimenten mit den angegebenen $\gamma\delta$ T-Zelllinien bzw. Klonen in Kokultur mit dem duktalem Pankreasadenokarzinom PT45P1 wiederholt werden (Abb. 3A). Um auszuschließen, dass die 4-stündige Periode des Zytotoxizitätstests zu kurz war um einen *Triggereffekt* der TLR Liganden auf die untersuchten Tumorzellen oder die $\gamma\delta$ T-Zellen zu erzielen, wurde die Inkubationszeit verlängert.

Aus diesem Grund wurde die Tumorzelllinie PT45P1 (Pankreaskarzinom) mit den TLR Liganden poly(I:C) bzw. Imiquimod für 20 Stunden vorinkubiert und anschließend 2x gewaschen. Die Vorinkubation der Tumorzelllinie PT45P1 führte zu einer gesteigerten Lyse durch $\gamma\delta$ T-Zellen. (Abb. 3B). Eine zusätzliche Restimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit dem PAg BrHPP führte zu einer zusätzlichen Steigerung der $\gamma\delta$ T-Zell-Zytotoxizität gegenüber der mit den TLR Liganden vorbehandelten PT45P1 (Abb. 3C).

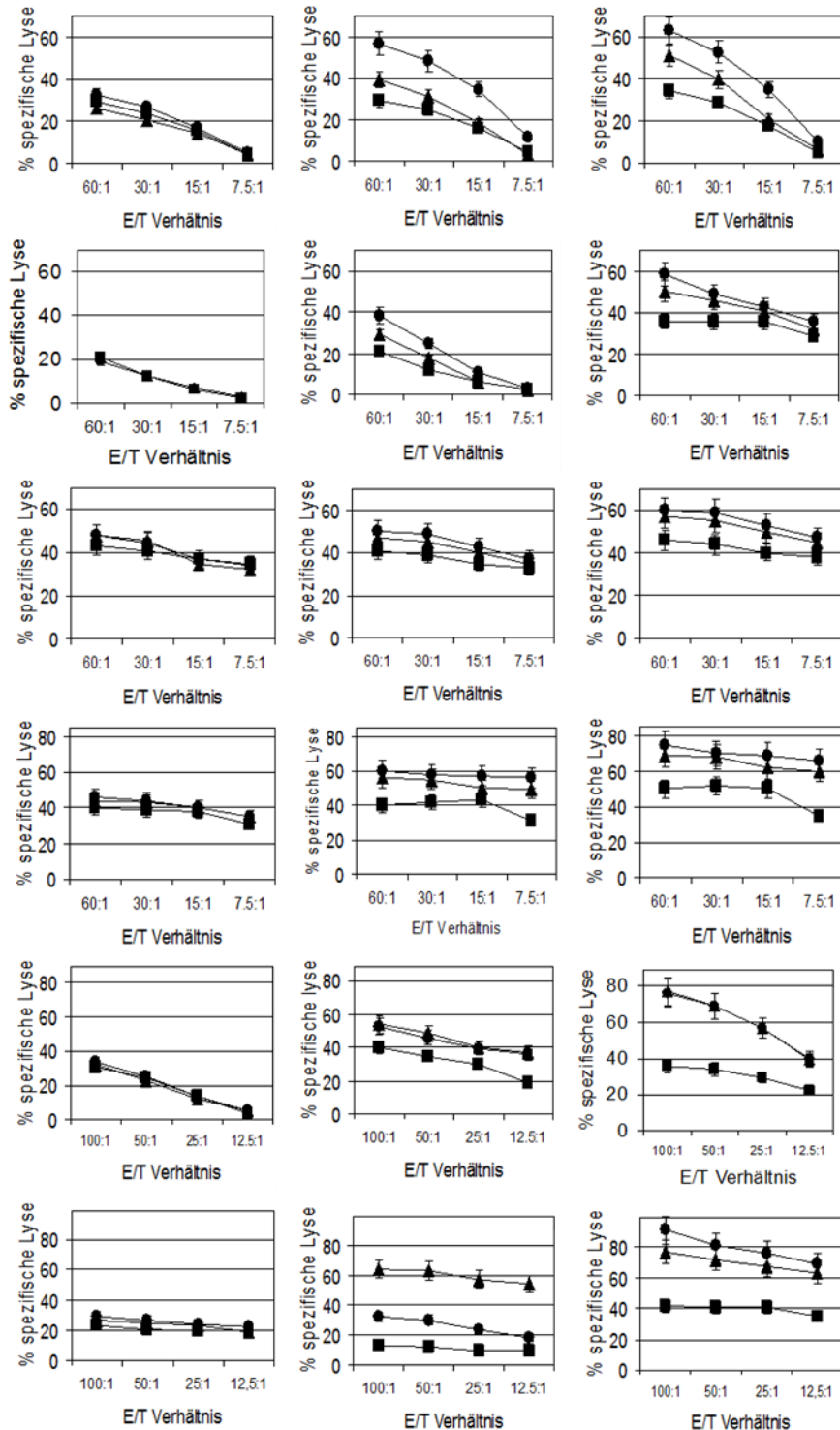
V γ 9V δ 2 T-Zellen

**Gesundspender 1
(GS1)
Zelllinie**

A. Direkte Zugabe

B. Medium

C. BrHPP



■ Med. ● Poly(I:C) ▲ Imiquimod

Abbildung 3. Darstellung der gesteigerten $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität nach Vorbehandlung der Tumorzellen. V γ 9V δ 2 T Zell-Linien/-Klone von gesunden Spendern (GS1-GS4) und Krebspatienten (KP1-KP2) wurden als Effektorzellen gegenüber PT45P1 mit den angegebenen E:T-Verhältnissen eingesetzt. Poly(I:C) oder Imiquimod wurden direkt in die Kokultur aus Tumorzellen und $\gamma\delta$ Effektorzellen hinzugefügt (A).

Alternativ wurden Tumorzellen (B, C) für 20 Stunden mit den angegebenen TLR Liganden vorbehandelt, gewaschen und mit den $\gamma\delta$ T Zelllinien kokultiviert. In einigen Versuchen wurden die $\gamma\delta$ T Zelllinien/-Klone mit 200 nmol/L BrHPP bei 37° C vorbehandelt und anschließend zu den mit ^{51}Cr -markierten Zielzellen hinzugefügt (C). Der Mittelwert wurde aus dreifacher Bestimmungen berechnet (die Standardabweichung (SD) war < 10%). Die Punkte in der Graphik stellen die Durchschnittswerte von zwei bis vier unabhängigen Experimenten mit den selben Spendern dar.

Ähnliche Ergebnisse konnten in unabhängigen Experimenten mit zwei weiteren V γ 9V δ 2 T-Zelllinien von gesunden Spendern (GS5-GS6) bzw. Krebspatienten (KP3-KP4) ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich zu den $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten die $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$ T-Zellen derselben Spender keine relevante Lyse der getesteten Tumorzellen, unabhängig davon ob eine Vorbehandlung mit den TLR Liganden durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Als Vergleich diente eine Mediumkontrolle.

Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren Versuchen mit den Pankreasadenokarzinomen (Panc89, PancTu-I, Colo357), den Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (*SCCHN*) (PCI-1, BHY) oder des Lungenkarzinoms (Lungen-Ca 459) mit den selben $\gamma\delta$ T-Zelllinien bzw. Klonen beobachtet (Abb. 4A-F). Eine Vorinkubation von Panc89, PancTu-I, Colo357, Lungen-CA 459, PCI-1, und BHY mit den TLR Liganden poly(I:C) und Imiquimod führte in drei unabhängigen Untersuchungen zu einer gesteigerten Zytotoxizität der mit BrHPP aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 4A-F). Interessanterweise wurde die Pharynx-Tumorzelllinie BHY mit der höchsten TLR 3 Expression nach Vorbehandlung mit dem TLR3 Liganden poly(I:C) verstärkt durch die $\gamma\delta$ T-Zellen lysiert (Abb. 4F). Im Gegensatz dazu führte eine Vorbehandlung der Tumorzelllinie Colo357 (Pankreasadenokarzinom) trotz der hohen intrazellulären TLR7 Expression nach Inkubation mit dem TLR7 Liganden Imiquimod zu keiner nennenswerten Steigerung der $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität (Abb. 4C). Das Melanoma MeWo erwies sich ebenfalls in mehreren Versuchen als resistent gegenüber einer $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Lyse nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit den TLR Liganden poly(I:C) und Imiquimod (Abb. 4G). Der Mangel an intrazellulärem TLR3 in der Tumorzelllinie MeWo könnte hier die Resistenz gegenüber der gesteigerten Lyse nach Vorbehandlung mit poly(I:C) erklären (Abb. 2A). Dennoch führte auch die Vorbehandlung mit dem TLR7 Liganden Imiquimod zu keiner Steigerung der Lyse der TLR7 exprimierenden MeWo Tumorzelle. Dies lässt vermuten, dass zusätzliche bzw. andere Mechanismen in der gesteigerten TLR abhängigen Tumorzelllyse involviert sind (siehe folgende Kapitel).

4.3 Einfluss von Aminobisphosphonaten (n-BP) auf die $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität

Aminobisphosphonate (n-BP) mittlerer Potenz wie das Alendronat aktivieren $\gamma\delta$ T-Zellen.

n-BPs induzieren eine Akkumulation und Freisetzung von $\gamma\delta$ T-Zellen stimulierenden PAg in Makrophagen oder Tumorzellen und führen zu einer Hochregulation von NKG2D Liganden wie ULBP2 und ULBP3, welche in einer gesteigerten Effektorfunktion der $\gamma\delta$ T-Zellen resultiert (Gober et al, 2003; Kistowska et al., 2008; Daten nicht gezeigt).

Um zu beweisen, dass MeWO prinzipiell empfindlich ist gegenüber einer $\gamma\delta$ T-Zell-abhängigen Lyse ist, wurde die Tumorzelllinie MeWO mit dem n-BP Alendronat vorbehandelt (Abb. 4H). Ferner wurden in den folgenden Untersuchungen getestet inwieweit mit PAg BrHPP vorbehandelte V γ 9V δ 2 T-Zelllinien von gesunden Spendern und Krebspatienten die Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs lysieren. Hierfür wurden die unterschiedlichen Tumorzelllinien für 20 Stunden mit Medium oder mit den TLR3 und TLR7 Liganden poly(I:C) und Imiquimod vorinkubiert. Als positive Kontrolle für die Lyse wurde MeWo 20 Stunden mit Alendronat vorbehandelt (Abb. 4H). Anschließend wurde die Lyserate anhand des Zytotoxizitätstests bestimmt (Abb. 4A-H). Die mit den TLR Liganden vorbehandelten Tumorzellen wurden bis auf das Melanom MeWo verstärkt durch die $\gamma\delta$ T-Zelllinien lysiert. Im Gegensatz dazu sah man keine verstärkte Lyse des Melanoms MeWo nach Vorbehandlung mit den TLR3- und TLR7 Liganden. In der Kontrolle zeigten unsere Ergebnisse nach 20-stündiger Vorbehandlung der MeWo Zellen mit 5 μ mol/L Alendronat eine erwartungsgemäß verstärkte Lyserate im Zytotoxizitätstest (Abb. 4G-H). Diese Ergebnisse wurden in zwei bis drei unabhängigen Versuchen reproduziert.

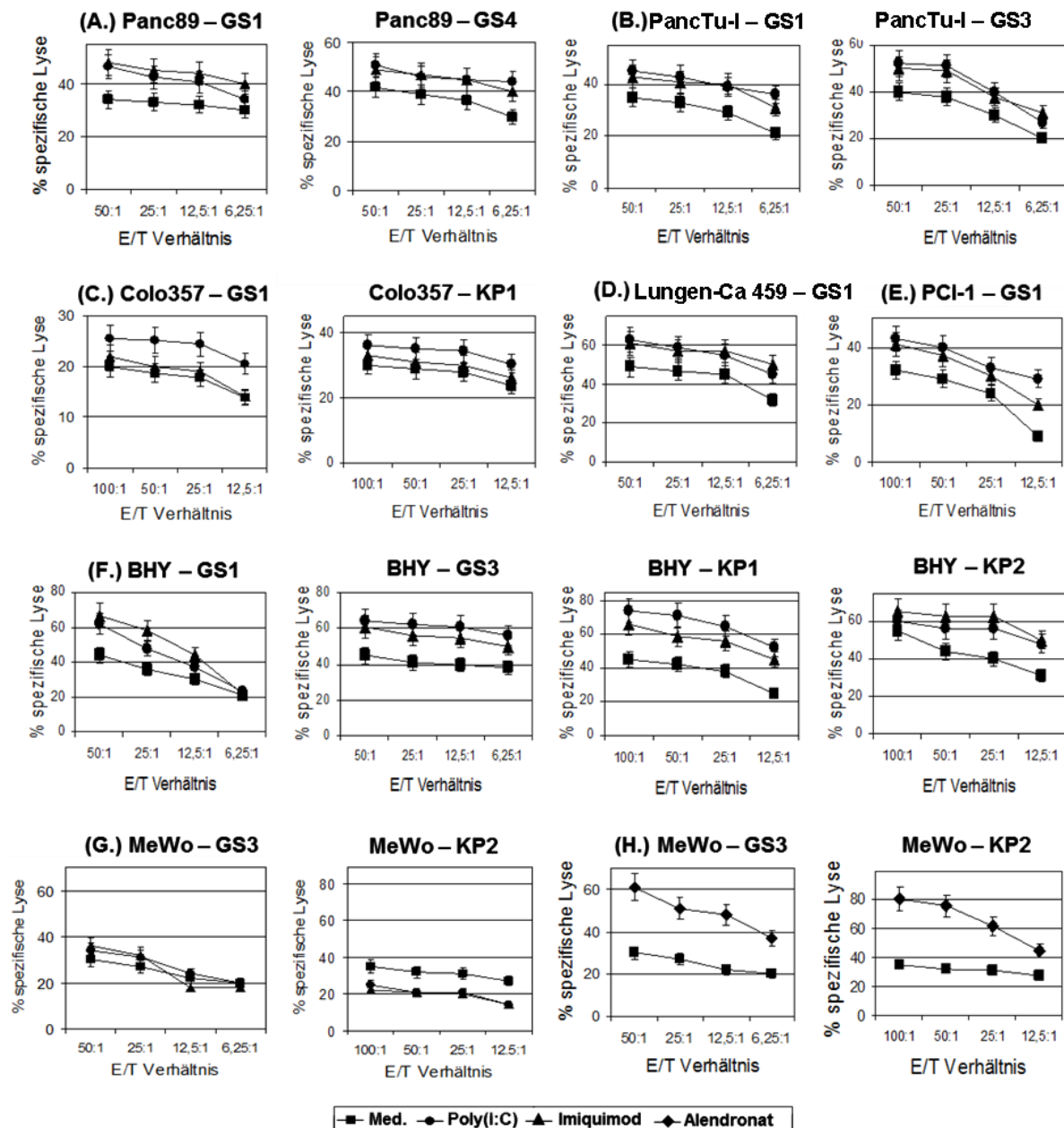


Abbildung 4. Darstellung der gesteigerten Lyse unterschiedlicher Tumorzellen nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit TLR Liganden und Alendronat.

V γ 9V δ 2 T-Zelllinien (GS1, GS2) und Klone (GS3, GS4) von gesunden Spendern sowie Linien von Krebspatienten (KP1, KP2) wurden mit BrHPP präinkubiert bevor die im Medium (Vierecke), im poly(I:C) (Kreise) oder Imiquimod (Dreiecke) vorbehandelten Tumorzellen hinzugefügt wurden (A-H). Als positive Kontrolle für die Lyse wurde MeWo für 20 h mit 5 μ mol/L Alendronat vorbehandelt (Raute) (G,H). Die Mittelwerte wurden aus Dreifach-Bestimmungen ermittelt (SD < 10%). Die Punkte stellen die Mittelwerte von zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit denselben Spendern dar.

Als nächstes stellte sich die Frage, welche Mediatoren für die gesteigerte Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den Tumorzellen verantwortlich sind. Da einige der duktaalen Pankreasadenokarzinome weitgehend resistent gegenüber eines Fas/FasL induzierten Zelltodes sind (Kabelitz et al., 2004), konzentrierte ich mich in meiner Arbeit auf die Freisetzung von Granzymen A und B. Bei den Granzymen handelt es sich um Serinproteasen, die in sekretorischen Vesikeln zytotoxischer Effektor-Lymphozyten gespeichert werden. Granzym A wird auch als Serinesterase bezeichnet und hat die Substratspezifität einer Trypsase und spielt bei der getriggerten Apoptose eine Rolle. Granzym B ist eine Aspartase und ist auch bekannt als Fragmentin 2. Wenn es sich im Zytosol der Zielzelle befindet, kann es auf verschiedenen Wegen Apoptose induzieren. Der hauptsächliche Mechanismus verläuft über die Mitochondrien und führt über die Aktivierung der Caspasenkaskade zur Apoptose der Zelle.

In meinen Versuchen habe ich das duktaale Pankreasadenokarzinom PT45P1 für 20 Stunden im Medium oder mit den TLR Liganden poly(I:C) und Imiquimod vorbehandelt und anschließend für vier Stunden in eine Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen gebracht. Die Granzyme A und B wurden nach diesen vier Stunden mit Hilfe eines ELISAs aus dem Zellkulturüberstand bestimmt (Abb. 5A und 5B). In Übereinstimmung mit der gesteigerten Tumorlyse konnte in vier unabhängigen Versuchen mit Doppelwerten eine erhöhte Produktion von Granzym A und B nachgewiesen werden. Zudem wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein signifikanter Anstieg des intrazellulär akkumulierten Granzym B in den untersuchten $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet (Abb. 5C).

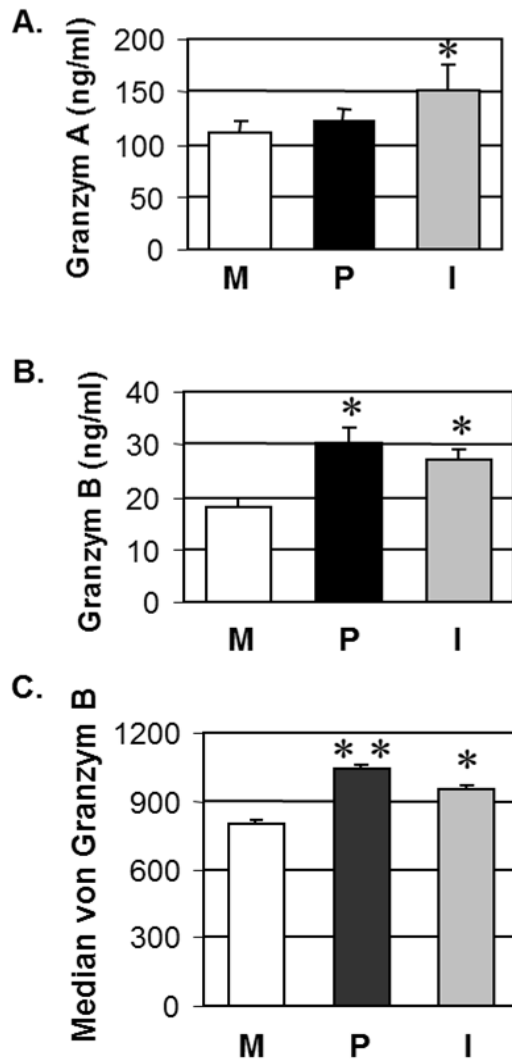


Abbildung 5. Die Vorbehandlung der Tumorzellen mit poly(I:C) oder Imiquimod führt zu einer Steigerung der Granzymproduktion in $\gamma\delta$ T-Zellen.

PT45P1 wurde für 20 Stunden mit Medium (M), poly(I:C) (P) oder Imiquimod (I) vorbehandelt und für vier Stunden in eine Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen von gesunden Spendern (HD1, HD2) und Krebspatienten (CP1, CP2) in Anwesenheit von BrHPP gebracht. (A) Granzyme A und (B) Granzyme B wurden mittels ELISA im Zellkulturüberstand, welcher nach diesen vier Stunden der Kokultur 4 h gesammelt wurde, gemessen. Der Mittelwert von vier verschiedenen Versuchen mit Doppelwerten ist gezeigt. Die Signifikanz wurde mit dem einseitig gepaarten student t-test bestimmt und ist als * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ dargestellt. (C) Intrazelluläres Granzyme B wurde mittels Durchflusszytometrie mit Alexa Fluor 647 gelabelten mAK in $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt, welche nach 4-stündiger Kokultur mit Tumorzellen mit einem FITC-gelabeltem anti-V δ 2 mAK markiert wurden. Um zwischen $\gamma\delta$ T Zellen und Tumorzellen zu unterscheiden wurde ein *Gate* auf die FITC⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen gesetzt. Die mediane Fluoreszenzintensität von Granzym B ist dargestellt.

Basierend auf den oben genannten Ergebnissen wurde im weiteren ein Fokus auf die Aufklärung möglicher Mechanismen der gesteigerten $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität gegenüber den mit TLR Liganden vorbehandelten Tumorzellen gelegt. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Einfluss von poly(I:C) und Imiquimod auf das Überleben der Tumorzellen oder deren Zelltod sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen als auch die Modulation von kostimulierenden Faktoren näher untersucht.

4.4 Einfluss von poly (I:C) und Imiquimod auf Tumorzelltod

Berichten zufolge können TLR3 und TLR7 Agonisten programmierten Zelltod auslösen indem sie einen direkten zytostatischen und/oder zytotoxischen Effekt in verschiedenen Brust-, Haut- und Blasenkrebszelllinien sowie in Patienten mit malignen Melanomen oder Basalzellkarzinomen ausüben (Salaun et al., 2006; Schon et al., 2004; Inglefield et al., 2006; Smith et al., 2007). Poly(I:C)-vermittelter Zelltod beinhaltet sowohl die *Toll/IL-1R Domain-Containing-Adaptor* (TIRAP)-abhängige Produktion von IFN- β als auch die Aktivierung verschiedener extrinsischer Caspasen und NF- κ B p65, welche für die Auslösung von programmiertem Zelltod erforderlich sind (Salaun et al., 2007; Salaun et al., 2006). In ähnlicher Weise soll auch Imiquimod durch Aktivierung des Adaptermoleküls *Myeloid Differentiation Primary Response 88* (MyD88) und des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Induktion eines Caspase-abhängigen Zelltodes führen. Programmierter Zelltod (Apoptose) wurde in den unterschiedlichen Tumorzellen nach Vorinkubation der TLR Liganden mit Hilfe von Annexin-V und PJ bestimmt (Daten nicht gezeigt). Einen direkten poly(I:C)- bzw. Imiquimod-induzierten Zelltod konnte lediglich in der Tumorzelllinie Colo357 ausgelöst werden und in den weiteren untersuchten Karzinomzelllinien ausgeschlossen werden. Die Vorbehandlung von Colo357 Zellen mit TLR3 bzw. TLR7 Liganden für 20 Stunden führte zu einem gesteigerten Zelltod (70%). Für die Zytotoxizitätstests wurden natürlich vorher die vitalen Colo357 Zellen per mikroskopischer Auszählung bestimmt und entsprechend in dem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. Während der 4-stündigen Periode der Zytotoxizitätstests konnte kein weiterer Zelltod festgestellt werden. In Übereinstimmung mit dem Ausbleiben des durch TLR Liganden induzierten Zelltodes in den meisten untersuchten Tumorzelllinien, konnte auch kein Typ I IFN im Überstand der Tumorzellen nach Stimulation mit TLR Liganden nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.5 Einfluss von poly(I:C) und Imiquimod auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen

Nach 20 stündiger Inkubation der Tumorzelllinien PT45P1 (Pankreasadenokarzinom) und BHY (Pharynxkarzinom) mit dem TLR3 Liganden poly(I:C) konnte eine hohe Produktion von IL-6 im ELISA gemessen werden. Dieser Effekt wurde nach Stimulation derselben Tumorzelllinien mit Imiquimod nicht beobachtet (Abb. 6A). Weiterhin zeigte sich ein geringfügig erhöhte Konzentration von TNF- α nach Stimulation der Tumorzelllinien PT45P1 und BHY mit poly(I:C) sowie nach Stimulation der PT45P1 mit Imiquimod (Abb. 6B).

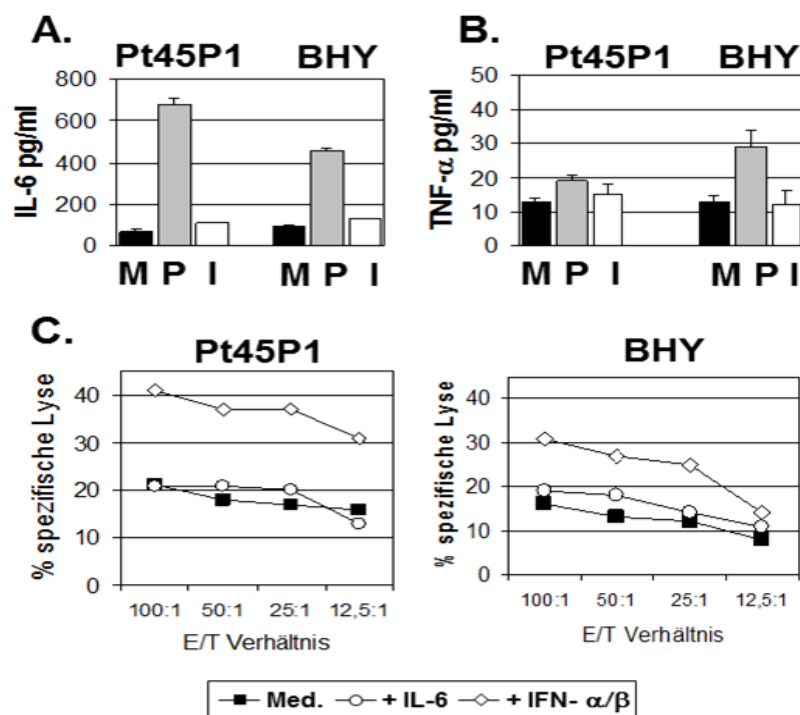


Abbildung 6. IL-6 zeigt keinen Effekt auf die $\gamma\delta$ T Zellzytotoxizität.

(A) PT45P1 und BHY wurden im Medium (M) kultiviert oder mit poly(I:C) (P) oder Imiquimod (I) für 20 Stunden stimuliert. IL-6 und TNF- α wurden durch Immunlite (automatischer Chemilumineszenz *Immunoassay Analyzer*) bestimmt. Hier sind die Ergebnisse von drei verschiedenen Versuchen mit Doppelwerten gezeigt (A, B). (C) Die Lyse der Tumorzelllinien PT45P1 und BHY durch $\gamma\delta$ T Zellen wurde mit dem angegebenen *Effector/Target* (E/T) Verhältnis überprüft. Die $\gamma\delta$ T Zelllinien eines gesunden Spenders wurden in Abwesenheit (Viereck) oder Anwesenheit (Kreis) von 10ng/mL rekombinantem IL-6 oder IFN- α/β (Raute) mit den entsprechend angegebenen Tumorzellen kokultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen von einem von zwei vergleichbaren Experimenten. (SD < 10 %). Die Anwendung von generierten $\gamma\delta$ T-Zellen anderer Spender lieferte ähnliche Ergebnisse.

Eine gesteigerte Proliferation oder das Überleben von einigen Tumorzellen vermittelt durch eine vermehrte autokrine IL-6 Produktion nach Stimulation mit TLR7/8 Agonisten, eine Polarisation von Immunzellen gegenüber Zellen, welche das Tumorstadium fördern, durch Zytokine wie IL-6, TNF- α und Makrophagen-inhibitorischem Faktor (MIF) sowie die Induktion von Regulatoren des Zellüberlebens wie *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) und phospho-AKT durch TLR Liganden wurde bereits durch andere Forscher beschrieben (Bohnhorst et al., 2006; Jegu et al., 2006; Kelly et al., 2006). Interessanterweise beobachteten wir bei den Plattenepithelkarzinomen nach Vorinkubation mit poly(I:C) in Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen eine leichte Reduktion des spontanen Zelltodes (Daten nicht gezeigt). Allerdings resultierte aus der Vorbehandlung der Plattenepithelkarzinome mit poly(I:C) in Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen ein erhöhter Zelltod statt Zellüberleben (Abb. 4E, F). Eine Erklärung für die erhöhte Zelltoxizität durch die $\gamma\delta$ T-Zellen könnte der niedrige Level an IL-6 sein, welches möglicherweise während der 4-stündigen Phase des Zytotoxizitätstests sezerniert wurde. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt, dass die untersuchten Tumorzellen nach 20-stündiger Inkubation mit poly (I:C) eine hohe Menge an IL-6 produzierten (Abb. 6A, B), welches in den Waschschrritten zur Vorbereitung des Zytotoxizitätstests rausgewaschen wurde. Um die Wirkung von IL-6 zu untersuchen, wurde während der 4-stündigen Dauer des Zytotoxizitätstests rekombinantes IL-6 in die Kokultur aus $\gamma\delta$ T-Zellen und Tumorzellen hinzugefügt. Die Zugabe von rekombinantem IL-6 führte zu keiner Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Tumorlyse, jedoch konnte die Lyse in Anwesenheit von rekombinaten Typ I IFNen (IFN α/β ; vermutlich physiologisch hauptsächlich produziert durch dendritische Zellen; Abb. 6C) gesteigert werden. Die Areaktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen auf IL-6 konnte mit der beobachteten fehlenden IL-6 Rezeptor-Expression auf allen getesteten $\gamma\delta$ T-Zelllinien in Einklang gebracht werden (Daten nicht gezeigt; Oberg et al., 2006).

4.6 Einfluss von poly(I:C) und Imiquimod auf die Modulation von kostimulierenden Faktoren

Des Weiteren wurde in vorliegender Doktorarbeit untersucht, ob eine Stimulation mit TLR Liganden zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen führt. Keine der getesteten Tumorzelllinien bis Panc89 Zellen exprimierten CD80/CD86 oder CD40 Liganden auf der Oberfläche (Daten nicht gezeigt). Die Vorbehandlung der Tumorzellen mit Imiquimod oder poly(I:C) führte auch nicht zu einer Hochregulation von CD80, CD86 oder CD40 Ligand (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden weitere kostimulatorische Moleküle wie die

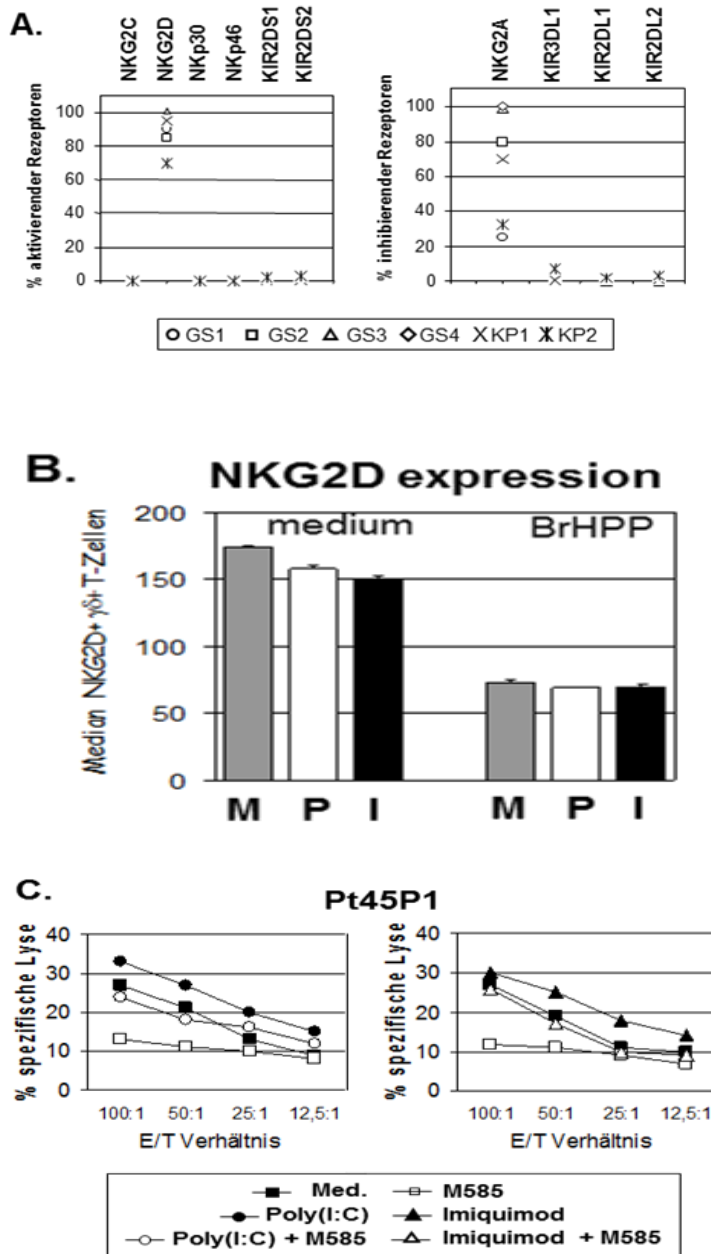


Abbildung 7. Die Rolle der NKG2D/NKG2D Liganden Interaktion auf die durch TLR Liganden vermittelte gesteigerte $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität.

(A) Die Expression von aktivierenden und inhibitorischen NKR auf den Zelloberflächen von $\gamma\delta$ T-Zelllinien/-Klonen von den Spendern wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. (B) Die Oberflächenexpression von NKG2D auf der $\gamma\delta$ T-Zelllinie von Krebspatient (KP1) wurde nach Kultivierung im Medium oder BrHPP und 4-stündiger Kokultur mit der Tumorzelllinie PT45P1, welche für 20 Stunden mit Medium (M), poly(I:C) oder Imiquimod vorbehandelt war, anhand der Durchflusszytometrie gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität von drei unabhängigen Versuchen mit einem repräsentativen Spender. (C) PT45P1 wurde für 20 Stunden mit den angegebenen TLR Liganden vorbehandelt, gewaschen und in Dreifachansätzen mit $\gamma\delta$ T-Zellen eines Krebspatienten (KP1) kokultiviert. Die $\gamma\delta$ T-Zellen von KP1 wurden vorher entweder in Medium

oder mit anti-NKG2D mAb M85 vorbehandelt. Ähnliche Ergebnisse wurden in parallel durchgeführten Experimenten mit den $\gamma\delta$ T-Zelllinien von gesunden Spendern (GS 1 und 3) erhalten.

NKG2D Liganden, welche die Aktivierung und zytotoxische Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen vergleichbar wie bei den NK-Zellen regulieren können (Rincon-Orozco et al., 2005; Wrobel et al., 2007). Zur Untersuchung der Expression von NKG2D Liganden auf den Tumorzellen und den entsprechenden Rezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Zellen wurden diese nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit Medium, poly(I:C) oder Imiquimod kokultiviert und nach 4 Stunden die entsprechende Expression durchflusszytometrisch analysiert. Alle getesteten Tumorzelllinien ausgenommen MeWo exprimierten die NKG2D Liganden MICA/B und ULBP 2-3 und die NKG2A Liganden MHC-Klasse-I Moleküle (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet exprimierten die meisten der V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zelllinien von gesunden Spendern wie auch von Tumorpatienten den aktivierende NKG2D Rezeptor auf der Zelloberfläche, wohingegen der inhibitorische NKG2A Rezeptor unterschiedlich exprimiert wurde (Abb. 7A). Andere aktivierende Rezeptoren, wie NKG2C, NKp30, NKp46, KIR2DS1, und KIR2DS wurden nicht exprimiert (Abb. 7A). Die inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL2 waren ebenfalls nicht messbar und der inhibierende Rezeptor KIR3DL1 war sehr schwach exprimiert (Abb. 7A).

Diese Resultate konnten anhand der Durchflusszytometrie in zwei bis drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

In weiterführenden Experimenten wurde die Möglichkeiten der Modulation von NKG2D und NKG2A und ihrer Liganden nach Kokultur von vorbehandelten Tumorzellen und $\gamma\delta$ T-Zellen überprüft. Es ließ sich beobachten, dass die NKG2D Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von Tumorzellen bereits 4 Stunden nach TZR Stimulation (BrHPP) abnahm, jedoch kam es zu keiner weiteren Abnahme der NKG2D Expression bei Kokultivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen mit poly(I:C)- oder Imiquimod vorbehandelten Tumorzellen (Abb. 7B). Die Expression von NKG2A wurde ebenfalls nicht in Anwesenheit von poly(I:C)- oder Imiquimod behandelten Tumorzellen reguliert (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde die NKG2D Liganden Expression auf Tumorzellen nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit TLR Liganden nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), welches vermuten lässt dass der NKG2D/NKG2D Ligand Signalweg nicht in die verstärkte $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit TLR Liganden involviert ist. Dies konnte zudem im Zytotoxizitätstest unter Verwendung des anti-NKG2D mAb M585 bestätigt werden. Bei $\gamma\delta$ T-

Zellen, die mit Tumorzellen unter Zugabe von anti-NKG2D mAk M585M kokultiviert wurden, war die Zytotoxizität gegenüber diesen Tumorzellen reduziert. Die Vorbehandlung

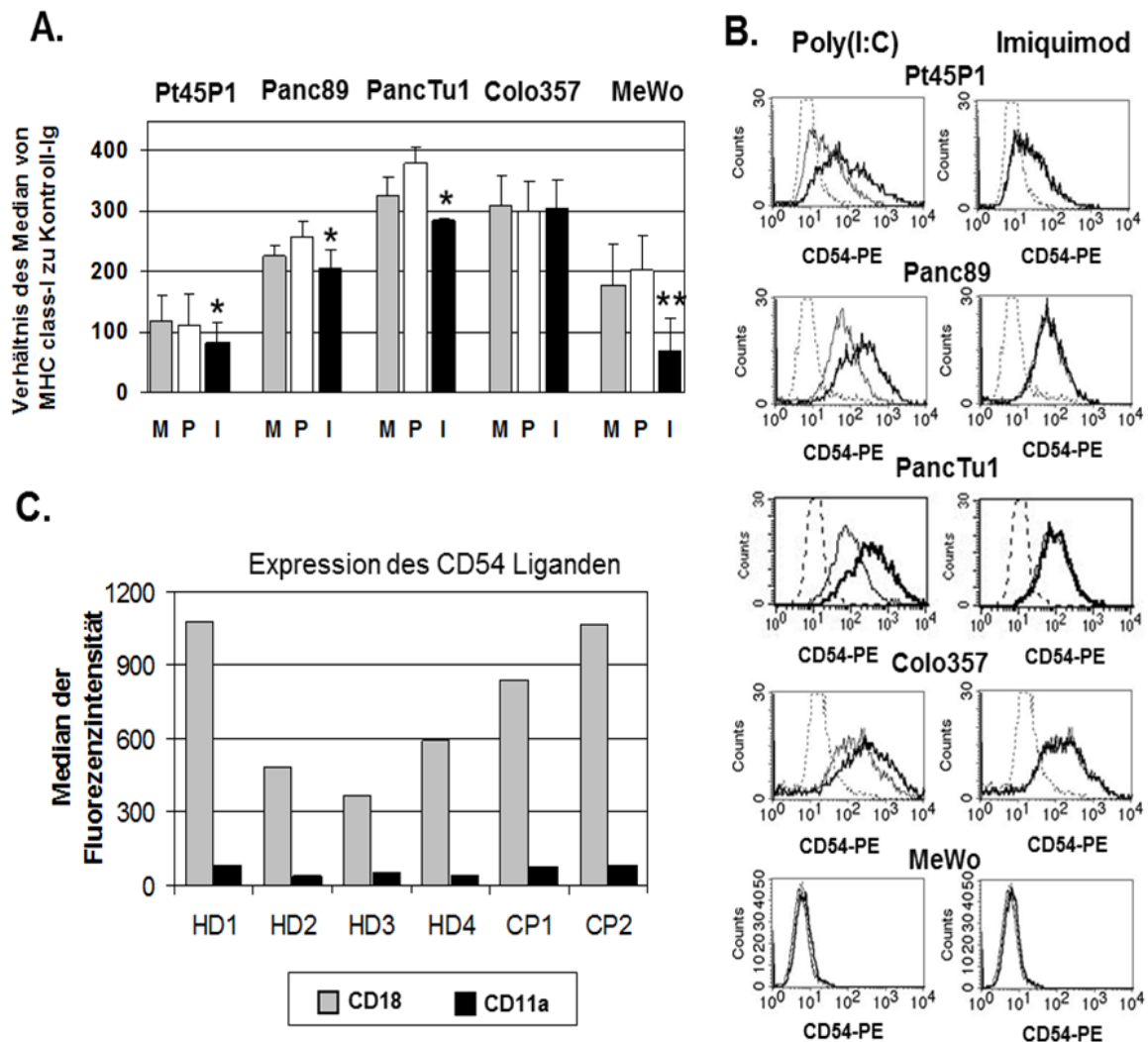


Abbildung 8. Darstellung der Abnahme der MHC-I-Klasse Moleküle auf Tumorzellen nach Vorbehandlung mit Imiquimod und Hochregulation von CD54 nach Vorbehandlung mit poly(I:C). Pankreasadenokarzinome oder MeWo wurden für 20 Stunden mit Medium (M), poly(I:C) (P) oder Imiquimod (I) vorbehandelt. (A) Die Tumorzellen wurden mit anti-MHC-Klasse-I mAk W6/32 oder mit einer entsprechenden Isotypkontrolle markiert. Das Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der MHC-Klasse-I Expression zur Isotypkontrolle wurde in vier unabhängigen Experimenten mit einem gesunden Spender (GS1) und einem Krebspatienten (KP1) berechnet. Die Signifikanz wurde mit dem einseitig gepaarten student t-test bestimmt und ist als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ dargestellt.

(B) Messung der CD54 (ICAM-1) Expression auf der Zelloberfläche der angegebenen Tumorzelllinien nach Inkubation im Medium (dünne Linie), poly(I:C) (dicke Linie; Bilder auf der linken Seite) oder Imiquimod (dicke Linie; Bilder auf der rechten Seite). Die gepunktete Linie stellt die jeweilige Isotypkontrolle dar. Vergleichbare Expressionen wurden in drei unabhängigen Experimenten beobachtet. (C) Darstellung der mittleren

Fluoreszenzintensität von CD11a und CD18 für $\gamma\delta$ T Zelllinien/-Klone der angegebenen Spender. Eine von zwei repräsentativen Färbungen sind dargestellt.

der PT45P1 Zellen mit poly(I:C) bzw. Imiquimod verhinderte jedoch eine vollständige Hemmung der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Lyse in Anwesenheit von anti-NKG2D mAk. Die TLR Ligand Vorbehandlung von PT45P1 reduzierte die $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität in Anwesenheit von anti-NKG2D mAk lediglich auf das Niveau welches bei unbehandelten Tumorzellen ohne anti-NKG2D mAk M585 zu messen war (Abb. 7C).

Interessanterweise führte jedoch eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit Imiquimod zu einer signifikanten Abnahme der Expression von MHC-Klasse-I Moleküle auf den Tumorzellen, die sensitiv gegenüber der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Lyse waren. (Abb. 8A).

Die Daten lassen vermuten, dass die Abnahme der MHC-Klasse-I Moleküle auf den Imiquimod behandelten Tumorzellen die Bindungsaffinität zum inhibitorischen Rezeptor NKG2A vermindert und dies in einer gesteigerte Tumorzelllyse resultiert. Als Kontrollen dienten Colo357- bzw. MeWo Zellen. Die Vorbehandlung der Tumorzelllinie Colo357 mit dem TLR7 Liganden Imiquimod führte zu keiner Abnahme der MHC-Klasse-I Moleküle auf diesen Zellen. Dies korrelierte mit dem Ausbleiben einer verstärkten $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber Colo357 Zellen. Im Unterschied dazu wurden MHC-Klasse-I Moleküle auf mit Imiquimod vorbehandelten MeWo Tumorzellen runterreguliert. Die Lyse der Imiquimod behandelten MeWo Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen wurde jedoch nicht verstärkt, was sich mit der fehlenden Expression von NKG2D Liganden auf MeWo erklären lässt (Wrobel et al.; 2007).

Ferner zeigen vorliegende Ergebnisse, dass eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit poly(I:C) zu keiner Herunterregulation der MHC-Klasse-I Moleküle führte (Abb. 8A). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eventuell die poly(I:C) Behandlung von Tumorzellen eine Modulation von Adhäsionsmolekülen bewirkt, welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen zytotoxischen $\gamma\delta$ T Zellen und Tumorzellen spielen könnte. Guo und Kollegen konnten zeigen, dass eine Blockierung mit anti-CD54 oder anti-CD18 Antikörpern die $\gamma\delta$ T-Zellvermittelte Tumorzelllyse reduziert (Guo et al., 2005). In Übereinstimmung mit deren Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit nachweisen, dass eine fehlende CD54 Expression zusammen mit einer niedrigen Konzentration von NKG2D Liganden auf MeWo Tumorzellen zu einer verminderten Lysekapazität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den MeWo Tumorzellen führte. Des Weiteren konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass eine

Vorbehandlung der Tumorzellen mit poly(I:C) jedoch nicht mit Imiquimod zu einer gesteigerten CD54 Expression auf diesen Zellen führt (Abb. 8B). Dies wiederum korrelierte hervorragend mit einer gesteigerten Tumorzelllyse nach Vorbehandlung mit poly(I:C) (Abb. 3B,C und 4A-F).

Eine Kinetik über 24 Stunden in Kokulturen bestehend aus Tumorzellen und $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von TLR Liganden zeigte, dass eine Regulation von MHC-Klasse-I Moleküle durch Imiquimod bzw. von CD54 durch poly(I:C) diese Zeitspanne benötigt und nicht schon nach 4 Stunden stattfindet. Diese Ergebnisse erklären, warum die direkte Zugabe von TLR3 und TLR7 Liganden für 4 Stunden im Zytotoxizitätstest zu keiner gesteigerten $\gamma\delta$ -T-Zellzytotoxizität führt (Abb. 3A). Ferner wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass eine poly (I:C) Zugabe zu einer gesteigerten TNF- α Produktion führte (Abb. 6B).

Guo et al. berichten, dass TNF- α die CD54 Expression verstärkt (Guo et al., 2005). Zudem korrelierte die gesteigerte $\gamma\delta$ -T-Zellzytotoxizität gegenüber poly(I:C) vorbehandelten Tumorzellen (Abb. 3 und 4) mit der Intensität der CD54 Liganden Expression CD11a/CD18 auf den $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 8C). Unsere Daten lassen vermuten, dass verschiedene Mechanismen in die Modulation der Tumorzelllyse durch TLR3 und TLR7 Liganden involviert sind.

5 Diskussion

In der Tumorimmuntherapie hat sich gezeigt, dass zahlreiche Tumore sehr effektiv durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten lysiert werden können. In einigen klinischen Studien mit Patienten, welche an Non-Hodgkin Lymphomen, Multiplem Myelom sowie Prostata-, Brust- bzw. Nieren-Karzinomen litten, konnte eine partielle Tumorreduktion durch Aktivierung der $V\gamma9V\delta2$ -exprimierenden $\gamma\delta$ T-Zellen belegt werden. Die Tumorpatienten erhielten *in vivo* synthetische PAg oder n-BP, die $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen stimulieren. Alternativ erhielten die Patienten *ex vivo* isolierte $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen, welche *in vitro* mit PAg oder n-BP expandiert wurden (Dieli et al., 2007; Meraviglia et al., 2010; Kunzmann et al., 2000 und 2012; Kobayashi et al., 2007; Wilhelm et al., 2003 und 2014).

Zudem besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen eine sehr hohe Plastizität, indem sie Eigenschaften von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems miteinander vereinen. Aufgrund der beachtlichen Plastizität geraten sie daher zunehmend in den Fokus einer T-Zell-basierten Immuntherapie gegenüber Tumoren (Lafont et al., 2014).

Vergleichbar den $\alpha\beta$ T-Lymphozyten der erworbenen Immunität exprimieren sie einen TZR-CD3-Komplex und brauchen kostimulatorische Moleküle für ihre Aktivierung. Nebst der TZR-abhängigen Erkennung der Antigene spielt bei $\gamma\delta$ T-Zellen der kostimulatorische Killer Rezeptor NKG2D (CD314) in der zytotoxischen Effektorfunktion der $\gamma\delta$ T-Zellen eine wichtige Rolle (Rincon-Orozco et al., 2005; Wrobel et al., 2007). NKG2D bindet an Stress induzierbare MHC-Klasse-I Antigene (MIC) A/B wie auch an UL16-gebundene Proteine (ULBP) 1-4 (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001). Auch andere natürliche Killerrezeptoren (NKR) wie der inhibitorisch wirkende Rezeptor NKG2A (CD159a), welches an MHC-Klasse-I Moleküle bindet oder die Interaktion mit Adhäsionsmolekülen wie der CD11a/CD18 (LFA-1)-CD54 Interaktion können die $\gamma\delta$ T-Zellzytotoxizität beeinflussen (O'Conner et al., 2006; Halary et al., 1997; Wesch et al., 2003; Guo et al., 2005).

Im Unterschied zu den konventionellen CD3-positiven $\alpha\beta$ T-Lymphozyten exprimieren die CD3-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen einen T-Zellrezeptor, der sich aus einer γ und δ Kette zusammensetzt und niedermolekulare phosphorylierte Antigene HLA-unabhängig erkennt (Hayday et al., 2000). Insbesondere ihre HLA-unabhängige Erkennung und das damit verbundene reduzierte Risiko eine *Graft versus Host Disease* auszulösen, prädestiniert $\gamma\delta$ T-Zellen für eine allogene Stammzelltransplantation bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Wilhelm et al., 2014; Bertaina et al., 2014).

Andererseits können sie ähnlich wie die Zellen der angeborenen Immunität als „professionelle“ APZ fungieren, indem sie Tumorantigene aus absterbenden Tumorzellen aufnehmen, sie prozessieren und sie $\alpha\beta$ T-Zellen präsentieren. Dadurch kann eine tumorspezifische $\alpha\beta$ T-Zellantwort induziert werden (Brandes et al., 2009; Himoudi et al., 2012).

Zirkulierende und tumorinfiltrierende $\gamma\delta$ T-Zellen üben ihre Effektorfunktion über die Produktion einer hohen Menge an Zytokinen aus (IFN- γ , TNF- α). Zudem werden zytotoxische Mediatoren wie Perforine und Granzyme produziert (Matarollo et al., 2007; Dieli et al., 2007).

Eine wichtige Voraussetzung für eine T-Zell-basierte Immuntherapie gegenüber soliden Tumoren wie z.B. dem Ovarialkarzinom oder dem duktalem Pankreas-Adenokarzinom ist eine Infiltration von T-Lymphozyten in den Tumor. In jüngster Zeit konnte die Arbeitsgruppe, in der vorliegende Arbeit angefertigt wurde, eine höhere Frequenz von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten als $\alpha\beta$ T-Zellen in den Gewebeschnitten von Patienten mit Pankreastumoren detektieren. $\gamma\delta$ T-Zellen akkumulierten in den Gewebeschnitten der Pankreastumorpatienten in den Gangepithelien. Dies deutet auf eine Mobilisation und Infiltration in Pankreastumore und damit auch auf eine $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber Pankreastumoren hin (Helm et al., 2014; Oberg et al., 2014).

Das duktales Pankreas-Adenokarzinom ist einer der häufigsten Pankreastumore und sehr aggressiv ebenso wie die Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches, da sie meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (Siegel et al., 2012 und 2015).

Beim duktalem Pankreas-Adenokarzinom liegt der therapeutische Erfolg unter 20%. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer chirurgischen Resektion liegt bei $< 15\%$ (Siegel et al., 2015). Unabhängig von genetischen Veränderungen spezifischer Protoonkogene und Tumorsuppressoren trägt die inflammatorische und immunsuppressive Mikroumgebung des duktalem Pankreas-Adenokarzinom entscheidend zu der Progression und Manifestation der Tumore bei (Lunardi et al. 2014). Oftmals ist das duktales Pankreasadenokarzinom auch resistent gegenüber einer Strahlen- oder Chemotherapie (Leung et al., 2012).

Charakteristisch für das duktales Pankreasadenokarzinom ist das desmoplastische Stroma, welches aus nicht zellulären Kompartimenten (Extrazellulärer Matrix) sowie aus diversen immunsuppressiven Zellen wie den Tumor-assoziierten Makrophagen, den mesenchymalen Zellen (z.B. Fibroblasten, Sternzellen), den myeloiden Suppressorzellen (*myeloid-derived*

suppressor cells; MDSC) oder den regulatorischen T-Zellen besteht, die eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen wie den $\gamma\delta$ T-Lymphozyten vermeiden können (Lunardi et al., 2014). Karzinome des Kopf- und Halsbereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*: HNSCC) sind maligne Tumore mehrerer Lokalisationen im oberen aerodigestiven Trakt, und gehören zu den zehnhäufigsten Todesursachen bei Krebserkrankungen weltweit und zeigen eine steigende Tendenz. Es handelt sich in mehr als 90% der Fälle um Plattenepithelkarzinome, es sind also Tumore epithelialen Ursprungs (Massano et al., 2006).

Im Jahr 2000 gingen ca. 300000 Todesfälle weltweit auf das Konto von Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs, gleichzeitig waren rund 500000 Neuerkrankungen zu verzeichnen (Shibuya et al., 2002). In den industrialisierten Ländern ist der Durchschnitt mit 18,8 pro 100000 Männer und 7,2 pro 100000 Frauen relativ hoch (Jemal et al., 2006).

Die weltweite 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 50%, wobei mehr Frauen als Männer überleben (Parkin et al., 2005). Diese ungünstigen 5 Jahres-Überlebensrate haben sich seit 30 Jahren nicht verbessert (Edwards et al., 2005; Kastenbauer und Wollenberg, 1999).

Die Prognose für den Patienten ist stark abhängig vom Krankheitsstadium bei Diagnosestellung. Wenn zu dem Zeitpunkt noch keine Metastasierung vorliegt (Tx N0 M0), beträgt die 5 Jahres-Überlebensrate 82%. Bestehen bereits Lymphknotenmetastasen aber keine Fernmetastasen (Tx Nx M0) ist sie bei nur 51%. Lassen sich bei Diagnose bereits Fernmetastasen feststellen (Tx Nx Mx) ist die Überlebensrate trotz vollständiger Therapie bei nur durchschnittlich 28% nach 5 Jahren. Leider liegt bei Diagnosestellung in der Mehrzahl der Fälle, nämlich in 61%, bereits ein Lymphknotenbefall vor, so dass eine ungünstige Prognose für die meisten Patienten besteht (Edwards et al., 2005).

In vorliegender Arbeit wurde untersucht inwiefern $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut bzw. aus Aszites von Krebspatienten *ex vivo* sich mit PAg wie BrHPP unter Zugabe von IL-2 stimulieren lassen. Durchflusszytometrisch konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass der relative Prozentsatz der CD3-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut von gesunden Spendern und Krebspatienten höher war als im Aszites der untersuchten Krebspatienten. Zudem ließen sich die $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Aszites von Patienten mit Pankreas-, Ovarial-, oder Brustkrebs weder durch eine Stimulation mit BrHPP und IL-2 noch nach erfolgter Depletion der CD4-/CD25-positiven regulatorischen T Zellen gefolgt von einer Stimulation zur Proliferation bringen. Dies verdeutlicht, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen aus Aszites nicht reaktiv waren.

$\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut derselben Probanden proliferierten unter den gleichen Versuchsbedingungen. Ein Grund für die stark verminderte Aktivierung der $\gamma\delta$ T Zellen

könnte auf den Einfluss einer immunsuppressiven Tumorumgebung hindeuten. Ferner wäre denkbar, dass ein hoher Anteil an löslichem MICA im Aszites dafür verantwortlich ist. Marten und Kollegen (2006) konnten eine erhöhte Konzentration von löslichem MICA im Serum von Pankreastumorpatienten detektieren. Das sogenannte *shedding* von NKGD2 Liganden wie MICA durch Proteasen ist als eine Art *tumor escape* Mechanismus beschrieben. Lösliche NKGD2 Liganden binden vergleichbar dem membranständigen NKGD2 Liganden an NKGD2, was nach Internalisierung ein inhibitorisches anstatt eines aktivierenden Signals in der Effektorzelle induziert (Märten et al., 2006).

Ferner könnten auch immunsuppressive Zytokine im Mikromilieu des Tumors wie z.B. der *Transforming growth factor* (TGF)- β , Prostaglandin (PG) E2 oder IL-10 sowie Chemotherapeutika oder auch eine Apoptosesensitivität der $\gamma\delta$ T-Zellen nach repetitiver Aktivierung dafür verantwortlich sein (Martinet et al., 2009; Oberg et al., 2015).

Eine permanente *in vivo* Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten bedingt durch eine repetitive Stimulation derer kann auch zu einer Art Erschöpfung der $\gamma\delta$ T-Zellen führen (Dieli et al., 2007; Braza et al., 2013; Cosica et al., 2012).

Aus diesem Grund galt es in dieser Arbeit herausfinden, ob eine zusätzliche Gabe von TLR Agonisten die Erschöpfung überkommen kann und die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den Tumorzellen erhöht (Capietto et al., 2010).

TLR werden sowohl von Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen Immunantworten. Im 19. Jahrhundert konnte bereits William Coley einen anti-tumoralen Effekt nach Injektion des *Coley Toxins* in Tumore beobachten. Das *Coley Toxin* bestand aus einer Mischung abgetöteter Bakterien der Spezies *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* zusammen mit den noch aktiven Endotoxinen. Coley erreichte mit seiner Methode eine Heilungsrate von 10 % bei Weichteilsarkomen mit beträchtlichen Nebenwirkungen. Die Entwicklung der Chemo- und Strahlentherapie verdrängten das *Coley Toxin* (Rakoff-Nahoum et al., 2009; Cho et al., 2006). Später konnte man zeigen, dass bakterielle DNA über TLR9 Bindung und Lipopolysaccharide über TLR4 Bindung, die bakteriellen Produkte waren, eine anti-Tumorantwort in Form einer vermehrten Zytokinproduktion, einer verstärkten Aktivierung der angeborenen Immunabwehr und einer erhöhten Zytotoxizität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen bewirkten (Hennessy et al., 2010).

Als erster TLR Agonist war der Arzneistoff Imiquimod (TLR7 Ligand) zur topischen Behandlung von externen und perianalen Feigwarzen auf dem Markt und wurde Anfang des

21. Jahrhunderts von der FDA zugelassen (Schöfer, 2007). Später wurde Imiquimod auch zur Behandlung von Basaliomen, Aktinische Keratosen oder bei Lentigo maligna Melanomen eingesetzt (Skinner 2004 und Skinner et al., 2007; Patel et al., 2007).

Bisher wurde einige TLR7/8 Agonisten entwickelt und befinden sich in klinischen Studienphasen (Smits et al., 2008; Hemmi et al., 2002; Schon et al., 2008).

Imidazoquinoline (852A), ein Molekül was strukturell sehr ähnlich zu Imiquimod ist, kann systemisch appliziert werden und wird momentan in klinischen Studien der Phase I und II zur Behandlung von Melanomen, Brust-, Ovarialkrebs sowie Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches untersucht (Dudek et al., 2007; Weigel et al., 2012; Kaufmann et al., 2012).

Zudem wurden auch einige TLR3 Liganden für die klinische Anwendung entwickelt, da poly(I:C) sehr schnell im menschlichen Körper ineffektiv wird. Poly-ICLC (HiltinolTM), ein poly(I:C) Derivat, befindet sich momentan in Phase II der klinischen Studien zur Behandlung von soliden Tumoren (Salazar et al., 2014; Hartmann et al., 2014).

Ferner wurden die synthetisch veränderte Struktur von poly(I:C), die (polyI:polyC₁₂U) dsRNA (Hemispherx's Ampligen) in Phase I und II der klinischen Studien zur Behandlung von Brustkrebs, Ovarialkrebs, Hirntumoren und dem Erschöpfungssyndrom (Chronic Fatigue Syndrom, CFS) getestet (Jasani et al., 2009).

Die Mechanismen der anti-tumoralen Abwehr von Imiquimod waren zum Zeitpunkt der Anfertigung der Doktorarbeit noch relativ unklar.

Es war bekannt, dass Imiquimod eine MyD88-abhängige Aktivierung und poly(I:C) eine MyD88-unabhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF und NFκB und damit die Freisetzung anti-viraler und anti-tumoraler Typ I Interferone sowie IL-6 und TNF-α in Zellen der angeborenen Immunabwehr induzieren kann (Chang et al., 2010).

Inwiefern Tumorzellen TLR exprimieren und ob TLR7 Agonist Imiquimod bzw. TLR3 Agonist poly(I:C) einen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen oder auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Tumorzellen haben oder eine Modulation kostimulatorischer oder anderer Moleküle auf Tumorzellen bewirken, war zu Beginn der Doktorarbeit noch weitgehend unbekannt.

Bis auf das maligne Melanom MeWo exprimierten alle getesteten Karzinome intrazellulär TLR3 (PT45P1, Panc89, PancTu1, Colo357, Lungen-Ca 459, PCI-1, BHY) und TLR7. Erwartungsgemäß wurde TLR3 nicht auf der Zelloberfläche exprimiert.

Im Zytotoxizitätstest führte eine direkte Zugabe des TLR3 bzw. TLR7 Liganden poly(I:C) und Imiquimod weder zu einer Steigerung der Lyse bei den gesunden Spendern noch bei den

Krebspatienten. Die Daten lassen vermuten, dass die 4-stündige Periode des Zytotoxizitätstest zu kurz war um einen Effekt der TLR Agonisten auf die untersuchten Tumorzellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen auszuüben. Eine 20-stündige Inkubation der Tumorzelllinien mit den TLR Agonisten führte bis auf Colo357 Zellen zu einer Steigerung der $\gamma\delta$ T-Zell-Zytotoxizität. Nebst den Colo357 Zellen erwies sich auch das maligne Melanom MeWo in mehreren Versuchen als resistent bezüglich der Vorbehandlung mit poly(I:C) und Imiquimod. Hierbei konnte die fehlende TLR3 Expression in der Tumorzelllinie MeWo die Resistenz gegenüber der gesteigerten Lyse nach Vorbehandlung mit poly(I:C) in Anwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen erklären. Da jedoch auch die Vorbehandlung mit Imiquimod zu keiner Steigerung der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Lyse der TLR7-exprimierenden MeWo Tumorzellen führte, liegt die Vermutung nahe, dass zusätzliche bzw. andere Mechanismen in der gesteigerten TLR-abhängigen Tumorzellyse involviert sind.

Ferner konnte in meinen Versuchen ein direkter poly(I:C)- bzw. Imiquimod induzierter Zelltod in den untersuchten Karzinomen ausgeschlossen werden. Lediglich Colo357 war sensitiv für den durch TLR Agonisten ausgelösten Zelltod, so dass die anschließende Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen deren Zytotoxizität nicht verstärkte (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Kontrast zu anderen Tumorzelllinien wie z.B. einigen Brustkrebs- oder Blasenkrebs Zellen, in welchen eine TRIF-abhängige Aktivierung die Produktion von IFN- β auslöste und eine NF κ B Aktivierung extrinsischer Caspasen. Sowohl IFN- β als auch Caspasen werden für die Induktion des Zelltods in den Brustkrebs- bzw. Blasenkrebs-Zellen benötigt (Salaun et al., 2006). In Übereinstimmung mit dem Ausbleiben des durch TLR Liganden vermehrt induzierten Zelltodes in den meisten der von mir untersuchten Tumorzelllinien, konnte kein Typ I IFN mittels ELISA im Überstand der Tumorzellen nach Stimulation mit TLR Liganden nachgewiesen werden (Shojaei et al., 2009).

Obwohl keine Typ I IFN in den von mir untersuchten TLR behandelten Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, produzierten einige Tumorzellen wie PT45P1 und BHY große Mengen an IL-6 nach poly(I:C) Stimulation und TNF- α nach Stimulation durch TLR3- als auch TLR7 Ligand Stimulation. Die Beobachtung einiger Autoren, dass eine TLR Ligand-vermittelte IL-6 Produktion autokrin das Überleben von Tumorzellen gewährleistet, konnte in vorliegender Arbeit in Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen nur bei den Plattenepithelkarzinomen beobachtet werden (Jego et al., 2006; Shojaei et al., 2009). Die Vorinkubation mit poly(I:C) in Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen bewirkte in den von mir untersuchten Plattenepithelkarzinomen eine leichte Reduktion des spontanen Zelltodes. Die Kokultur von

TLR3- bzw. -7 Liganden vorbehandelten Tumorzellen mit $\gamma\delta$ T Zellen verstärkte jedoch den Zelltod. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Zytotoxizität durch $\gamma\delta$ T Zellen könnte natürlich eine niedrige IL-6 Konzentration während der 4-stündigen Periode des Zytotoxizitätstests sein. Aus diesem Grund wurden in den Zytotoxizitätstests größere Mengen des rekombinanten IL-6 zugeführt, die jedoch zu keiner erhöhten $\gamma\delta$ T-Zell- vermittelten Tumorlyse führte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung der Arbeitsgruppe, dass aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen kein IL-6R exprimieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere nicht gemessene Zytokine wie z.B. von Tumorzellen produziertes IL-8 oder IL-12 einen Einfluss auf die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Lyse haben könnte.

Weiterhin machen die Ergebnisse der Arbeit auch deutlich, dass eine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 oder CD40 Ligand nach Stimulation der Tumorzellen mit TLR3- bzw. -7 Liganden in diesem Kontext keine Rolle spielte. Kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 Ligand waren initial auf den Tumorzellen nicht exprimiert. Die Herunterregulation kostimulatorischer Moleküle gilt als ein Mechanismus der Tumorzellen der Immunabwehr zu entkommen, da für die Ausübung der Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen kostimulatorische Signale wichtig sind. Nebst den klassischen Interaktionspartnern der Kostimulation, spielen bei $\gamma\delta$ T-Zellen aufgrund ihrer bereits erwähnten hohen Plastizität auch andere Interaktionspaare eine Rolle. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Kooperation mit anderen Forschern zeigen, dass die NKG2D/NKG2D-Ligand Interaktion die Aktivierung und Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen regulieren kann (Rincon-Orozco et al., 2005; Wrobel et al., 2007) Vergleichbar den NK-Zellen exprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen aktivierende NKR (z.B. NKG2D), die an NKG2D Liganden binden wie z.B. die nicht-klassischen, stress-induzierten, auf Tumorzellen exprimierten MICA-, MICB- und ULBP-Moleküle oder sie exprimieren inhibierende NKR (z.B. NKG2A), die an MHC- Klasse I Moleküle binden (Angelini et al., 2011, Groh et al., 2001; Bauer et al., 1999; Das et al., 2001; Wrobel et al., 2007). Diese Arbeit zeigt, dass auf den untersuchten $\gamma\delta$ T-Zelllinien nur der aktivierende NKG2D Rezeptor und mit unterschiedlicher Intensität der inhibierende NKG2A Rezeptor exprimiert wurden. Bis auf MeWo exprimierten alle untersuchten Tumorzelllinien die entsprechenden Liganden für NKG2D und NKG2A.

Die Rolle der TZR- bzw. NKG2D-abhängigen Liganden Erkennung wurde bereits in einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe untersucht. Wrobel et al stellten dabei fest, dass sowohl durch Vorinkubation von $\gamma\delta$ T-Zelllinien mit anti-TZR mAk als auch anti NKG2D mAk 585 die $\gamma\delta$ T-Zellvermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen inhibiert werden kann (Wrobel

et al., 2007). In vorliegender Arbeit konnte der anti-NKG2D mAk 585 jedoch nicht die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Lyse von TLR3- bzw. TLR7-Ligand behandelten Tumorzellen inhibieren. Ferner wurden weder die NKG2D Liganden auf den Tumorzellen noch der NKG2D Rezeptor auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach Kokultur mit TLR3- bzw. TLR7-Ligand vorbehandelten Tumorzellen beeinflusst. Diese Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass die NKG2D/NKG2D-Ligand Interaktion keine Rolle bei der gesteigerten $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Tumorzelllyse bei TLR vorbehandelten Zellen spielt durch (Shojaei et al., 2009). Die generelle Unfähigkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen die untersuchte MeWo Zelllinie zu lysieren, kann allerdings mit der fehlenden Expression von NKG2D Liganden begründet werden.

Die Behandlung der Tumorzellen mit Imiquimod führte jedoch zu einer Herunterregulation von MHC Klasse I Molekülen auf den untersuchten Tumorzellen. Die Ergebnisse der Arbeit lassen vermuten, dass der inhibitorische NKG2A Rezeptor auf $\gamma\delta$ T-Zellen entsprechend keinen Bindungspartner mehr findet, so dass dies die verstärkte $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Tumorzelllyse bei Imiquimod vorbehandelten Zellen erklären kann. Interessanterweise führte die Imiquimodbehandlung von Colo357 zu keiner Herunterregulation von MHC Klasse I Molekülen, was sehr gut mit der Beobachtung korreliert, dass Imiquimod-behandelte Colo357 die Lyse von $\gamma\delta$ T-Zellen nicht steigerte.

Die poly(I:C) Behandlung der Tumorzellen hatte keinen anderen Effekt auf die Expression von MHC Klasse I Molekülen allerdings auf die Expression des Adhäsionsmoleküls CD54. Guo und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 auf Pankreastumorzellen und deren entsprechenden Rezeptoren CD11a und CD18 auf $\gamma\delta$ T-Zellen von entscheidender Bedeutung für die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen ist (Guo et al., 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Tumorzellen mit poly(I:C) für 20 Stunden sowohl die Expression von CD54 als auch die TNF- α Produktion steigert. Eine gesteigerte TNF- α Freisetzung induziert laut Guo und Kollegen eine Hochregulation von CD54 (Guo et al., 2005), was den beobachteten Mechanismus sehr gut erklären würde. Zudem waren die entsprechenden Rezeptoren für CD54 auf den $\gamma\delta$ T-Zellen nach Kokultur mit den entsprechenden Tumorzellen reduziert. Obwohl die in der Arbeit vorgestellten Daten mit poly(I:C) gute Effekte aufweisen ist für eine Applikation von poly(I:C) Vorsicht geboten. Es sind zu bereits Nebeneffekte wie Nierenversagen oder hypersensitive Reaktionen nach poly(I:C) Gabe beschrieben (Jansani et al., 2009). Zudem wird poly(I:C) im Menschen sehr schnell inaktiviert (Pradere et al., 2015). In weiteren klinischen Studien mit Patienten mit Ovarialkarzinomen oder Gehirntumoren

werden alternative TLR3 Agonisten verwendet wie poly-ICLC (HiltinolTM) oder Rintatolimod (AmpligenTM), die stabile Derivate von poly(I:C) sind (Pradere et al., 2015).

Da $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls TLR3 exprimieren (Wesch et al., 2006), gab es in der Arbeitsgruppe auch die Überlegung $\gamma\delta$ T-Zellen, welche für einen adoptiven Transfer genutzt werden, vorzubehandeln um durch eine *in vivo* Applikation von TLR3 Agonisten mögliche unbekannte Nebenwirkungen u.a. auf verschiedene Zellpopulationen zu vermeiden. In Experimenten, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Behandlung der $\gamma\delta$ T-Zellen zwar ihre Zytokinproduktion verstärkte, jedoch nicht in einheitlichem Maße die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen (unveröffentlichte Beobachtungen).

Die vorgelegte Doktorarbeit soll zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der TLR-vermittelten Modulation der Zytotoxizität beitragen, um die möglicherweise Voraussetzungen für die klinische Prüfung neuartiger Immuntherapien solider Tumore mit aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen in Kombination mit TLR-Agonisten zu schaffen. Neu designte Derivate wie z.B. AmpligenTM oder HiltinolTM in Kombination mit zugelassenen Medikamenten wie n-BP, die $\gamma\delta$ T-Zellen stimulieren, könnten die Immuntherapie möglicherweise verbessern.

6 Zusammenfassung

TLR Agonisten gewinnen als Adjuvantien in klinischen Studien der Krebstherapie immer mehr an Bedeutung. Momentan wird TLR7 Agonist Imiquimod in erster Linie in der topischen Behandlung von Feigwarzen, Basaliomen, Aktinische Keratosen oder bei Lentigo maligna Melanomen eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der $\gamma\delta$ T-Zell-abhängigen Tumorlyse durch die TLR3 und -7 Liganden näher untersucht. Dabei war eine verstärkte Zytotoxizität sowie eine gesteigerte Produktion der zytotoxischen Mediatoren Granzym A und -B durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, welche mit TLR3 Ligand poly (I:C) bzw. TLR7 Ligand Imiquimod vorbehandelten Tumorzellen kokultiviert wurden, zu beobachten. Es wurden unterschiedliche TLR3- und TLR7-exprimierende Tumorentitäten wie duktales Pankreas-Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome des Hals- und Nackenbereichs oder ein Lungen-Karzinom untersucht.

Die 20-stündige Stimulation der duktales Pankreas-Adenokarzinome mit poly(I:C) gefolgt von einer Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen resultierte in einer verstärkten Expression von CD54 auf den Tumorzellen. Die Interaktion von CD54 und den korrespondierenden Liganden CD11a/CD18, welche auf den $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert werden, sind verantwortlich für die verstärkte Effektorfunktion in den $\gamma\delta$ T-Zellen.

Darüber hinaus führt die Stimulation mit Imiquimod zu einer verminderten Expression der MHC-Klasse-I Moleküle auf Tumorzellen, welches möglicherweise zu einer verminderten Bindungsaffinität des auf den $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten, inhibitorischen Rezeptors NKG2A führt. Diese in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen, dass eine Stimulation der Tumorzellen mit TLR3 und TLR7 Liganden zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen von Krebspatienten führt.

7 Literaturverzeichnis

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001; 413(6857):732-8.

Angelini DF, Zambello R, Galandrini R, Diamantini A, Placido R, Micucci F, Poccia F, Semenzato G, Borsellino G, Santoni A, Battistini L. NKG2A inhibits NKG2C effector functions of $\gamma\delta$ T cells: implications in health and disease. *J Leukoc Biol*. 2011; 89(1):75-84.

Arden B, Clark S, Kabelitz D, and Mak T. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995; 42:455-500.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 85(5428):727-9.

Beetz S, Marischen L, Kabelitz D, Wesch D. Human gamma delta T cells: candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol Res*. 2007; 37(2):97-111.

Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology*. 2008; 213(3-4):173-82.

Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galéa C, Salot S, Saiagh S, Audrain M, Rimbert M, Lafaye-de Micheaux S, Tiollier J, Négrier S. Phase-I study of Innacell $\gamma\delta$, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57(11):1599-609.

Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, Pende D, Falco M, Handgretinger R, Moretta F, Lucarelli B, Brescia LP, Li Pira G, Testi M, Cancrini C, Kabbara N, Carsetti R, Finocchi A, Moretta A, Moretta L, Locatelli F. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta$ + T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood*. 2014; 124(5):822-6.

Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Fløttum M, Knudsen L, Børset M, Espevik T, Sundan A. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2006; 20(6):1138-44.

Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(5):539-46.

Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintièrre C, Daniel P, Genetet N, Meunier B, Dupont-Bierre E, Boudjema K, Catros V. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57(4):531-9.

Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, Tampé R, Lévy F, Romero P, Moser B. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(7):2307-12.

Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol.* 2013; 160(2):123-32.

Burjanadzé M, Condomines M, Reme T, Quittet P, Latry P, Lugagne C, Romagne F, Morel Y, Rossi JF, Klein B, Lu ZY. In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2007; 139(2):206-16.

Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Gulotta G, Moschella F, Cordova A, Gulotta E, Salerno A, Dieli F. Aminobisphosphonates as new weapons for $\gamma\delta$ T Cell-based immunotherapy of cancer. *Curr Med Chem.* 2008; 15(12):1147-53.

Capietto AH, Martinet L, Cendron D, Fruchon S, Pont F, Fournié JJ. Phosphoantigens overcome human TCRV γ 9+ $\gamma\delta$ Cell immunosuppression by TGF- β : relevance for cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2010; 184(12):6680-7.

Cao W. UL16 binding proteins. *Immunobiology* 2004; 209:283-290.

Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res.* 2010; 59(10):791-808.

Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy.* 2009; 1(4):663-78.

Chitadze G, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Fürst D, Mytilineos J, Kalthoff H, Janssen O, Oberg HH, Kabelitz D. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. *Int J Cancer.* 2013; 133(7):1557-66.

Cho YJ, Ahn BY, Lee NG, Lee DH, Kim DS. A combination of E. coli DNA fragments and modified lipopolysaccharides as a cancer immunotherapy. *Vaccine.* 2006; 24(31-32):5862-71.

Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, Poccia F, Gessani S. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol.* 2005; 174(1):252-60.

Coscia M, Vitale C, Peola S, Foglietta M, Rigoni M, Griggio V, Castella B, Angelini D, Chiaretti S, Riganti C, Guarini A, Drandi D, Ladetto M, Bosia A, Foà R, Battistini L, Boccadoro M, Fournié JJ, Massaia M. Dysfunctional V γ 9V δ 2 T cells are negative prognosticators and markers of dysregulated mevalonate pathway activity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2012; 120(16):3271-9.

Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 2001; 14(2):123-33.

- Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita C, Spies T, Bukowski J. MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 2001; 15:83-93.
- Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl M, Hayday AC. Targeting human $\{\gamma\delta\}$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2007; 67(15):7450-7.
- Dudek AZ, Yunis C, Harrison LI, Kumar S, Hawkinson R, Cooley S, Vasilakos JP, Gorski KS, Miller JS. First in human phase I trial of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(23):7119-25.
- Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(19):1407-27.
- Espinosa E, Belmant C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagné F, Brailly H, Bonneville M, Fournié JJ. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human $\gamma\delta$ T cells. *J Biol Chem*. 2001; 276(21):18337-44.
- Garrity D, Call M, Feng J, Wucherpfennig K. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 2005; 102:7641-7646.
- Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 50(5):722-33.
- Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003; 197(2):163-8.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabtein K, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1999; 96:6879-6884.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp M, Riddel S, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by Mic induced on virus-infected cells. *Nat.Immunol*. 2001; 2:255-260.
- Gross J, Callas E, and Allison J. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J.Immunol*. 1992; 149:380-388
- Guo BL, Liu Z, Aldrich WA, Lopez RD. Innate anti-breast cancer immunity of apoptosis-resistant human $\gamma\delta$ -T cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 93(2):169-75.

- Halary F, Peyrat MA, Champagne E, Lopez-Botet M, Moretta A, Moretta L, Vié H, Fournié JJ, Bonneville M. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol.* 1997; 27(11):2812-21.
- Hartman LL, Crawford JR, Makale MT, Milburn M, Joshi S, Salazar AM, Hasenauer B, VandenBerg SR, MacDonald TJ, Durden DL. Pediatric phase II trials of poly-ICLC in the management of newly diagnosed and recurrent brain tumors. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014; 36(6):451-7.
- Hayday A. C. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu.Rev.Immunol.* 2000; 18:975-1026.
- Helm O, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg HH, Wesch D, Sebens S. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One.* 2014; 9(5):e94357.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2002; 3(2):196-200.
- Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(4):293-307.
- Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, Vernay B, Saraiva L, Wu Y, Cohen CJ, Gustafsson K, Anderson J. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol.* 2012; 188(4):1708-16.
- Hinz T, Wesch D, Halary F, Marx S, Choudhary A, Arden B, Janssen O, Bonneville M, Kabelitz D. Identification of the complete expressed human TCR V γ repertoire by flow cytometry. *Int Immunol.* 1997; 9(8):1065-72.
- Horton NC, Mathew PA. NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. *Front Immunol.* 2015; 6:31.
- Huber M, Lohoff M. Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis. *Allergo J Int.* 2015; 24(1):8-15.
- Huck S, Dariavach P, and Lefranc M. Variable region genes in the human T cell rearranging γ (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes. *EMBO J.* 1998; 7:719-726.
- Inglefield JR, Larson CJ, Gibson SJ, Lebrec H, Miller RL. Apoptotic responses in squamous carcinoma and epithelial cells to small-molecule toll-like receptor agonists evaluated with automated cytometry. *J Biomol Screen.* 2006; 11(6):575-85.
- Janssen O, Wesselborg S, Heckl-Ostreicher B, Pechhold K, Bender A, Schondelmaier S, Moldenhauer G, Kabelitz D. T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor $\gamma\delta$ + T cells. *J Immunol.* 1991; 146(1):35-9.

Jasani B, Navabi H, Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine*. 2009; 27(25-26):3401-4.

Jauhiainen M, Mönkkönen H, Räikkönen J, Mönkkönen J, Auriola S. Analysis of endogenous ATP analogs and mevalonate pathway metabolites in cancer cell cultures using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877(27):2967-75.

Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006; 20(6):1130-7.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006; 56(2):106-30.

Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9;101(10):3533-8.

Kabelitz D, Marischen L, Oberg HH, Holtmeier W, Wesch D. Epithelial defence by $\gamma\delta$ T cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005; 137(1):73-81.

Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zöller M. Characterization of tumor reactivity of human V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *J Immunol*. 2004; 173(11):6767-76.

Kabelitz D, Wesselborg S. Life and death of a superantigen-reactive human CD4⁺ T cell clone: staphylococcal enterotoxins induce death by apoptosis but simultaneously trigger a proliferative response in the presence of HLA-DR⁺ antigen-presenting cells. *Int Immunol*. 1992; 4(12):1381-8.

Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol*. 2005; 174(5):2878-84.

Kastenbauer E, Wollenberg B. [In search of new treatment methods for head-neck carcinoma]. [Article in German] *Laryngorhinootologie*. 1999; 78(1):31-5.

Kauffman EC, Liu H, Schwartz MJ, Scherr DS. Toll-like receptor 7 agonist therapy with imidazoquinoline enhances cancer cell death and increases lymphocytic infiltration and proinflammatory cytokine production in established tumors of a renal cell carcinoma mouse model. *J Oncol*. 2012; 2012:103298.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11(5):373-84.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006; 13(5):816-25.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007; 19(1):24-32.

Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(7):3859-68.

Kim DK, Kabat J, Borrego F, Sanni TB, You CH, Coligan JE. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol Immunol.* 2004; 41(1):53-62.

Kistowska M, Rossy E, Sansano S, Gober HJ, Landmann R, Mori L, De Libero G. Dysregulation of the host mevalonate pathway during early bacterial infection activates human TCR $\gamma\delta$ cells. *Eur J Immunol.* 2008; 38(8):2200-9.

Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, Minato N, Toma H. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using $\gamma\delta$ T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(4):469-76.

Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 2013; 38(1):119-30.

Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood.* 2000; 96(2):384-92.

Kunzmann V, Smetak M, Kimmel B, Weigang-Koehler K, Goebeler M, Birkmann J, Becker J, Schmidt-Wolf IG, Einsele H, Wilhelm M. Tumor-promoting versus tumor-antagonizing roles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial. *J Immunother.* 2012; 35(2):205-13.

Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud HA, Gros L, Eliaou JF, Bonnefoy N. Plasticity of $\gamma\delta$ T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Front Immunol.* 2014; 5:622.

Leung L, Radulovich N, Zhu CQ, Organ S, Bandarchi B, Pintilie M, To C, Panchal D, Tsao MS. Lipocalin2 promotes invasion, tumorigenicity and gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One.* 2012; 7(10):e46677.

Love WE, Bernhard JD, Bordeaux JS. Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Arch Dermatol.* 2009 Dec;145(12):1431-8. doi: 10.1001/archdermatol.2009.291.

Lunardi S, Muschel RJ, Brunner TB. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Lett.* 2014; 343(2):147-55.

Makkouk A, Abdelnoor AM. The potential use of Toll-like receptor (TLR) agonists and antagonists as prophylactic and/or therapeutic agents. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009; 31(3):331-8.

Märten A, von Lilienfeld-Toal M, Büchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity. *Int J Cancer.* 2006; 119(10):2359-65.

- Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournié JJ, Poupot R. A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2009; 39(3):752-62.
- Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(1):67-76.
- Mattarollo SR, Kenna T, Nieda M, Nicol AJ. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(8):1285-97.
- Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, La Mendola C, Guggino G, D'Asaro M, Orlando V, Scarpa F, Roberts A, Caccamo N, Stassi G, Dieli F, Hayday AC. In vivo manipulation of V γ 9V δ 2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol.* 2010; 161(2):290-7.
- Ness-Schwickerath KJ, Morita CT. Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing $\gamma\delta$ T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(14):2371-90.
- 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(1):41-9.
- Oberg HH, 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, Wesch D. Novel bispecific antibodies increase $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2014; 74(5):1349-60.
- Oberg HH, Wesch D, Grüssel S, Rose-John S, Kabelitz D. Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25^{high} regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006; 18(4):555-63.
- O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology.* 2006; 117(1):1-10.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.* 2013; 1;38(3):414-23.
- Ohteki T. Critical role for IL-15 in innate immunity. *Curr Mol Med.* 2002; 2:371-380
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(5):353-64.
- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(3):201-14.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2):74-108.

- Patel TS, Greer SC, Skinner RB Jr. Cancer concerns with topical immunomodulators in atopic dermatitis: overview of data and recommendations to clinicians. *Am J Clin Dermatol.* 2007; 8(4):189-94.
- Pietschmann K, Beetz S, Welte S, Martens I, Gruen J, Oberg HH, Wesch D, Kabelitz D. Toll-like receptor expression and function in subsets of human $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2009; 70(3):245-55.
- Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, Soldati-Favre D. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe.* 2008; 3(2):77-87.
- Pogge von Strandmann E, Shatnyeva O, Hansen HP. NKp30 and its ligands: emerging players in tumor immune evasion from natural killer cells. *Ann Transl Med.* 2015; 3(20):314.
- Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene.* 2014; 33(27):3485-95.
- Pries R, Hogrefe L, Xie L, Frenzel H, Brocks C, Ditz C, Wollenberg B. Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int J Mol Med.* 2008; 21(2):209-15.
- Rajalingam R. Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system. *Methods Mol Biol.* 2012; 882:391-414.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(1):57-63.
- Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells by NKG2D. *J Immunol.* 2005; 175(4):2144-51.
- Roberts A, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert E, and Jabri B. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J.Immunol.* 2001; 167:5527-5530.
- Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol.* 2006; 176(8):4894-901.
- Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res.* 2007; 13(15 Pt 1):4565-74.
- Salazar AM, Erlich RB, Mark A, Bhardwaj N, Herberman RB. Therapeutic in situ autovaccination against solid cancers with intratumoral poly-ICLC: case report, hypothesis, and clinical trial. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(8):720-4.
- Schöfer H. Evaluation of imiquimod for the therapy of external genital and anal warts in comparison with destructive therapies. *Br J Dermatol.* 2007; 157 Suppl 2:52-5.

Schön MP, Schön M. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis*. 2004; 9(3):291-8.

Schön MP, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2008; 7;27(2):190-9.

Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*. 2002; 2:37.

Shojaei H, Oberg HH, Juricke M, Marischen L, Kunz M, Mundhenke C, Gieseler F, Kabelitz D, Wesch D. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res*. 2009; 69(22):8710-7.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan; 62(1):10-29.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65(1):5-29.

Skinner R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. *J Cutan Med Surg*. 2004; 8 Suppl 3:22-31.

Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H, You X, Hwang D, Liu H, Scherr DS. Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2007; 177(6):2347-51.

Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist*. 2008, 13(8):859-75.

Steinle A, Groh V, and Spies T. Diversification, expression, and $\gamma\delta$ T cell recognition of evolutionary distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1998; 95:12510-12515.

Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical $\alpha\beta$ TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol*. 2001; 15;166(6):3923-32.

Upshaw JL, Leibson PJ. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol*. 2006; 18(3):167-75.

van de Berg PJ, van Leeuwen EM, ten Berge IJ, van Lier R. Cytotoxic human CD4(+) T cells. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20(3):339-43.

Viey E, Lucas C, Romagne F, Escudier B, Chouaib S, Caignard A. Chemokine receptors expression and migration potential of tumor-infiltrating and peripheral-expanded V γ 9V δ 2 T cells from renal cell carcinoma patients. *J Immunother*. 2008; 31(3):313-23.

Watts T, DeBenedette T and M. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr.Opin.Immunol*. 1999; 21:308-319.

Weigel BJ, Cooley S, DeFor T, Weisdorf DJ, Panoskaltsis-Mortari A, Chen W, Blazar BR, Miller JS. Prolonged subcutaneous administration of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced hematologic malignancies. *Am J Hematol.* 2012; 87(10):953-6.

Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krenkel K, Kabelitz D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Immunol.* 2006; 176(3):1348-54.

Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol.* 2001; 212(2):110-7.

Wesch D, Kabelitz D. Differential expression of natural killer receptors on V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 33(4):420-5.

Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(14):2357-70.

Wesch D, Peters C, Siegers GM. Human $\gamma\delta$ T regulatory cells in cancer: fact or fiction? *Front Immunol.* 2014; 5:598.

Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony HP. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood.* 2003; 102(1):200-6.

Wilhelm M, Smetak M, Schaefer-Eckart K, Kimmel B, Birkmann J, Einsele H, Kunzmann V. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells. *J Transl Med.* 2014; 12:45.

Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, Kabelitz D, Wesch D. 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. *Scand J Immunol.* 2007; 66(2-3):320-8.

Wu J, Song Y, Bakker A, Bauer S, Spies T, Lanier L, and Phillips J. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285:730.

Danksagung

Die eingereichte Doktorarbeit wurde am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Dietrich Kabelitz durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Kabelitz für die interessante Forschungsthematik und seiner sehr guten Betreuung bedanken.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela Wesch für die exzellente Betreuung und Anleitung während der gesamten wissenschaftlichen Phase, sowie ihrer engagierten Unterstützung bei der Planung der Versuchsreihen und Interpretation der Ergebnisse. Die vielen interessanten Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft auf beruflicher und privater Ebene haben mich sehr geprägt. Das Schulen im sterilen Umgang und die gewünschte gewissenhafte Sorgfalt von Frau Prof. Dr. Wesch waren mir in meinem weiteren beruflichen Werdegang von großem Nutzen. Letzendlich möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Wesch, meiner Mentorin, für ihre unermüdliche Einsatzbereitschaft und die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens bedanken.

Herrn PD Dr. Heiner Oberg danke ich für die fachliche und technisch kompetente Unterstützung an den Gerätschaften im Labor. Seine Geduld im Zwischenmenschlichen und seine strategischen Lösungsvorschläge für Probleme theoretischer und praktischer Natur waren mir in sehr vielen Situationen von großem Nutzen.

Weiterhin möchte ich mich bei den unterschiedlichen Arbeitsgruppen in der Immunologie bedanken, die mir in unseren wöchentlichen Diskussionsforen mit Ideen und Anregungen hilfreich zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Marischen der mir vor allem in der Anfangszeit sehr hilfreich zur Seite stand und mit Engelsgeduld meine vielen Fragen beantwortete.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei den MTA`s Monika Kunz, Hoa Ly, Alyn Beyer und Kirsten Krenzel, sowie bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, für ihre tatkräftige Unterstützung, ihrer fürsorglichen Art und für die heimische Atmosphäre ganz herzlich bedanken.

Danksagung

Für die Bereitstellung der Tumorzellen für die erfolgreiche Zusammenarbeit möchte ich ganz herzlich danken: Frau Prof. Dr. Barbara Wollenberg, Frau Prof. Dr. Margot Zöller, Herrn Prof. Dr. Frank Gieseler und Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff.

Schließlich danke ich Gott für die Auswahl meiner Eltern Zoja und Ali Shojaei und meinem Bruder Human Shojaei. Sie haben mir wichtige Werte vermittelt und mich zu einem guten Menschen erzogen. Meiner Freundin Stafanie Tenner danke ich für die vielen, tagtäglichen Erinnerungen in unserer gemeinsamen Wohnung zur Fertigstellung der Doktorarbeit.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Amir Hamed Shojaei
Geburtsdatum: 12.01.1980
Geburtsort: Iran / Isfahan
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

08/ 1990 – 07/ 1999 Kippenberg-Gymnasium in Bremen
06/ 1999 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium

10/ 1999 – 05/ 2008 Studium der Humanmedizin an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

09/ 2003 Vorärztliche Prüfung (Physikum)
05/ 2008 Ärztliche Prüfung (Hammerexamen)
06/ 2008 Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

08/ 2006 – 12/ 2006 Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Kiel
12/ 2006 – 04/ 2007 Pädiatrie, Universitätsklinikum S-H, Kiel
04/ 2007 – 07/ 2007 Chirurgie, Singapore General Hospital, Singapore

Berufsleben

08/ 2008–10/ 2011 Assistenzarzt zur Weiterbildung in der Traumatologie,
St. Antonius Krankenhaus, Köln
10/ 2011–06/ 2012 Assistenzarzt zur Weiterbildung in der Chirurgie
Kreis Krankenhaus Dormagen, Dormagen
06/ 2011–11/ 2014 Assistenzarzt zur Weiterbildung in der Orthopädie
Kreis Krankenhaus Dormagen, Dormagen
11/ 2014 Annerkennung als Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie,
Ärztelkammer Nordrhein
Seit 11/ 2014 Facharzt in der Orthopädie, Kreis Krankenhaus Dormagen,
Dormagen

Publikationsliste

Originalarbeiten

- 1) **Shojaei**, H, Oberg, H-H, Gieseler, F, Kabelitz, D, Wesch, D. Optimization of human $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity toward tumor cells by the usage of Toll-like receptor agonists. *Cancer Res.* 2009; 69(22):8710-7.
- 2) Wrobel, P, **Shojaei**, H, Schittek, B, Gieseler, F, Wollenberg, B, Kalthoff, H, Kabelitz, D, Wesch, D. Lysis of a broad range of epithelial tumor cells by human $\gamma\delta$ T cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand. J. Immunol.* 2007; 66: 320-328.

Wissenschaftliche Vorträge und Poster

- 1) **Shojaei**, H, Oberg, H-H, Kunz, M, Kabelitz, D, Wesch, D. Modulation of anti-tumor responses of $\gamma\delta$ T cells by TLR agonists. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austria and German Societies, September 3th-6th, 2008, Vienna, Austria
- 2) Wesch, D, **Shojaei**, H, Oberg, HH, Kabelitz, D. TLR agonists enhance $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity toward tumor cells. 3rd $\gamma\delta$ T Cell Conference, May 21th-23th, 2008, Marseille, France.
- 3) Wesch, D, Wrobel P, **Shojaei**, H, Kunz, M, Oberg HH, Kabelitz D (2007). Important aspects for the design of $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy. 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology, September 5th-8th, 2007, Heidelberg, Germany.

Erklärung

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

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

Köln, den 20.02.16

Amir Hamed Shojaei