

# Influence of Vitamin C on the differentiation and functional plasticity of human gamma delta T cells

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

**Léonce Kouakanou**

aus Cotonou, Bénin

Kiel, 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Bosch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dieter Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2019

Erscheinungsjahr: 2019

## SUMMARY

$\gamma\delta$  T cells are a numerically small subset of CD3<sup>+</sup> T cells in human peripheral blood. They have recently attracted substantial interest as effector cells for cellular immunotherapy, due to their MHC-independent recognition and lysis of many solid tumor and leukemia/lymphoma cells. Depending on the micro-environmental cues,  $\gamma\delta$  T cells also produce Th1/Th2/Th9/Th17-type cytokines, process and present antigen to conventional T cells, and can acquire regulatory activity. Potential clinical applications of *in vitro* expanded human  $\gamma\delta$  T cells include the adoptive transfer into cancer patients.  $\gamma\delta$  T cells can use different mechanisms to exert their effector functions. However, a better understanding of how their functional plasticity can be modulated is required to improve their translational efficacy. In this regard, it is important to develop novel strategies to optimize the culture conditions enabling maximal proliferative and functional activity. Vitamin C (L-ascorbic acid) is an essential vitamin that has to be supplied through appropriate nutrition or dietary sources. Vitamin C plays important roles in many different biological processes, spanning from stem cell differentiation to cancer cell biology. Moreover, Vitamin C has multiple effects on immune cells, acts as cofactor for several enzymes, has antioxidant activity and is known as facilitator of DNA hydroxymethylation through its capacity to enhance the capacity of Ten-eleven-translocation enzymes. The goal of the present thesis was to analyze the influence of the more stable derivative of Vitamin C, L-ascorbic 2-phosphate (pVC) on the differentiation and effector functions of human  $\gamma\delta$  T cells. Moreover, the mechanisms sustaining pVC-mediated  $\gamma\delta$  T-cell differentiation were also investigated.

The first part of this thesis studied the effect of pVC on the proliferation, differentiation and cytotoxic effector function. The results demonstrated that supplementation of pVC to the *in vitro* expanded human  $\gamma\delta$  T cells significantly enhances their proliferative expansion. Further investigations demonstrated that pVC does not prevent activation-induced death of (phospho)antigen-re-stimulated  $\gamma\delta$  T cells but rather enhances cell cycle progression and thereby cellular expansion. Moreover, pVC sustained the polarization of expanded  $\gamma\delta$  T cells towards a mixed Th1+2-like phenotype along with the expression of Th1 and Th2 signature cytokines. Finally, we observed that the cytotoxicity of the *in vitro* expanded  $\gamma\delta$  T cells against pancreatic cancer cell lines was enhanced in the presence of pVC and was associated with an increased release of IFN- $\gamma$ . In the second part, this thesis investigated the effect of pVC on the TGF- $\beta$ -induced expression of the regulatory T-cell-specific transcription factor Foxp3 and the resulting regulatory activity of purified human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. pVC induced a significant increase of TGF- $\beta$ -induced Foxp3 expression (both at protein and transcriptional levels) and stability as well as an increase in suppressive activity *in vitro*. Methylation

analysis of the Treg-specific demethylated region (TSDR) revealed that the TGF- $\beta$ -expanded  $\gamma\delta$  T cells treated with pVC showed a more pronounced demethylation of *FOXP3*. The third pillar of this thesis addressed the influence of pVC on the genome-wide gene expression and DNA methylation of human  $\gamma\delta$  T cells activated for eight days *in vitro*. At this time point, pVC had only minor effects on the transcriptome and genome-wide DNA methylation of the expanded  $\gamma\delta$  T cells.

Taken together, the results of this thesis demonstrated that Vitamin C has a significant influence on the functional activity of human  $\gamma\delta$  T cells and thus appears to be suitable for enhancing the effector function of  $\gamma\delta$  T cells for adoptive cell transfer in cancer patients. In addition, Vitamin C may also enhance the regulatory activity of  $\gamma\delta$  T cells (in the presence of TGF- $\beta$ ), which may be of interest in the context of autoimmune diseases.

## ZUSAMMENFASSUNG

$\gamma\delta$  T-Zellen stellen eine kleine Untergruppe von CD3-positiven T-Zellen im menschlichen peripheren Blut dar. Aufgrund ihrer HLA-unabhängigen Erkennung und Abtötung vieler Tumorzellen (sowohl solide Tumoren als auch Leukämien und Lymphome) haben  $\gamma\delta$  T-Zellen großes Interesse für die potenzielle Anwendung in der Immuntherapie erlangt. Abhängig vom umgebenden Mikromilieu können  $\gamma\delta$  T-Zellen auch Th1/Th2/Th9/Th17 Zytokine produzieren, Antigen prozessieren und präsentieren, sowie regulatorische Aktivität erwerben. Potenzielle klinische Anwendungen umfassen auch den adoptiven Zelltransfer in Krebspatienten.  $\gamma\delta$  T-Zellen können verschiedene Mechanismen benutzen, um ihre Funktion auszuüben. Ein besseres Verständnis ihrer funktionellen Plastizität ist jedoch erforderlich, um ihre translationale Anwendung zu verstärken. Es müssen daher neue Strategien zur Optimierung ihrer proliferativen und funktionellen Aktivität entwickelt werden. Vitamin C (L-Ascorbinsäure) ist ein essentielles Vitamin, das durch die Nahrungsaufnahme zugeführt werden muss. Vitamin C hat vielfältige Funktionen in diversen biologischen Prozessen. Es ist ein Kofaktor für mehrere Enzyme, hat anti-oxidative Wirkung, und aktiviert Ten-eleven-translocation Enzyme und beeinflusst damit DNA Methylierung. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Einfluß des stabileren phosphorylierten Vitamin C (L-ascorbic 2-phosphate, pVC) auf die Differenzierung und Effektorfunktionen von  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen zu untersuchen.

Im ersten Teil der Dissertation wurde der Einfluß von pVC auf die Proliferation, Differenzierung sowie zytotoxische Effektorfunktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass pVC die Proliferation *in vitro* signifikant verstärkt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass pVC nicht den aktivierungsinduzierten Zelltod von  $\gamma\delta$  T-Zellen verhindert, sondern vielmehr den Zellzyklus beeinflusst. Außerdem zeigten  $\gamma\delta$  T-Zellen in Gegenwart von pVC eine verstärkte Produktion von sowohl Th1- als auch Th2-Schlüssel-Zytokinen und eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber Pankreas Tumorzelllinien. Im zweiten Teil der Dissertation wurde der Einfluß von pVC auf die Expression des für regulatorische T-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 sowie die regulatorische Aktivität von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen untersucht. In Gegenwart von TGF- $\beta$  wurde durch pVC die Induktion von FoxP3 Expression sowohl auf Ebene der Transkription als auch der Proteinexpression signifikant verstärkt. Ferner stabilisiert pVC die Foxp3 Expression über einen längeren Zeitraum und erhöhte die suppressive Aktivität der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die Analyse des Methylierungs-Status der Treg-spezifischen demethylierten Region (TSDR) im *FOXP3* Gen zeigte eine massive Demethylierung nur in Gegenwart von pVC. Im dritten Teil der Dissertation wurde der Einfluß von pVC auf die genomweite Transkription und DNA Methylierung in  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 8

Tagen *in vitro* Aktivierung untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden nur geringe Einflüsse von pVC auf Transkriptom und Methylierung festgestellt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass Vitamin C einen erheblichen Einfluß auf die funktionelle Aktivität von humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen hat und somit geeignet erscheint, die Effektorfunktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen für den adoptiven Zelltransfer bei Krebspatienten zu verstärken. Andererseits kann Vitamin C auch die regulatorische Aktivität von  $\gamma\delta$  T-Zellen (in Gegenwart von TGF- $\beta$ ) verstärken, was im Rahmen von Autoimmunerkrankungen von Interesse sein könnte.