

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

Molekulare Signatur immunsuppressiver V γ 9V δ 2 T-Zellen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Mingram, Simon Sebastian

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle
2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

Tag der Disputation: 04.08.2020

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	III
III.	Tabellenverzeichnis	V
IV.	Abbildungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	8
1.1	Das menschliche Immunsystem	8
1.1.1	Grundlagen	8
1.1.2	Zelluläre Bestandteile des adaptiven Immunsystems	9
1.1.3	Oberflächenmoleküle von T-Zellen	11
1.1.4	$\gamma\delta$ T-Zellen	13
1.2	FoxP3	22
1.3	Apoptose	24
1.4	Gimap4	25
1.5	Zielsetzung	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Versuchsaufbau	28
2.2	Ethikvotum	28
2.3	Isolierung von mononukleären Zellen des Peripherblutes	29
2.4	Bestimmung der Zellzahl	29
2.5	Kultivierung und Anreicherung von Vγ9Vδ2 T-Zellen	30
2.5.1	Kulturmedium	30
2.5.2	Expansion von V γ 9V δ 2 T-Zellen	30
2.6	Isolierung Vγ9Vδ2 T-Zellen mittels MACS Technologie	31
2.7	Mixed Lymphocyte Culture (MLC)	32
2.7.1	Kulturbedingungen	32
2.7.2	CFSE labeling	33
2.7.3	Aktivierung durch DYNABeads	34
2.8	Durchflusszytometrie basierte Assays	34
2.8.1	Durchflusszytometrie	34
2.8.2	Apoptose Assay	36
2.8.3	CFSE Assay	37
2.8.4	Gimap4	37

2.9 Molekularbiologische Methoden	38
2.9.1 RNA Gewinnung	38
2.9.2 cDNA Synthese	40
2.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	40
2.10 Auswertung	43
2.10.1 Auswertung der Durchflusszytometrie	43
2.10.2 Grafiken und Statistik	43
3 Ergebnisse	45
3.1 Stimulation von Vγ9Vδ2 T-Zellen	45
3.2 Zytotoxisches Potenzial von Vγ9Vδ2 T-Zellen gegenüber aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen	46
3.2.1 Aktivierte V γ 9V δ 2 T-Zellen induzieren in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen Apoptose	46
3.2.2 Gimap4 induziert keine Apoptose in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen	49
3.2.3 Perforin und Granzyme B als möglicher zytotoxischer Wirkmechanismus	54
3.3 Immunsuppressives Potenzial von Vγ9Vδ2 T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen	59
3.3.1 Aktivierte V γ 9V δ 2 T-Zellen supprimieren $\alpha\beta$ T-Zellproliferation	59
3.3.2 FoxP3 und Gimap4 sind keine Marker für $\gamma\delta$ Treg-Zellen	62
3.4 Interferon-γ Expression	67
3.4.1 IL-12 induziert IFN- γ Expression	67
3.4.2 Interferon- γ Expression korreliert nicht mit der Expression von Gimap4	68
3.5 T-bet und Eomesodermin Expression	69
3.5.1 T-bet mRNA Expression	69
3.5.2 Korrelationen zwischen der T-bet Expression und der Interferon- γ Expression bzw. dem Anteil Gimap4+ V γ 9V δ 2 T-Zellen	70
3.5.3 Eomesodermin mRNA Expression	72
3.5.4 Korrelationen zwischen der Eomes Expression und der T-bet Expression bzw. dem Anteil Gimap4+ V γ 9V δ 2 T-Zellen	73
4 Diskussion	76
5 Zusammenfassung	83
6 Literaturverzeichnis	84
7 Erklärung zum Eigenanteil	93
8 Veröffentlichungen	94
9 Danksagung	95

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
APC	Antigenpräsentierenden Zellen
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BrHPP	Phosphoryliertes Bromohydrin
BTN	Butyrophilin
BZR	B-Zellrezeptor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Cystein-Aspartat-spezifische Protease
CD	Cluster of differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
Ct-Wert	threshold cycle - Wert
DETC	dendritische epidermale T-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Eomes	Eomesodermin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FasL	Fas Ligand
FBS	Fetales Kälberserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FPP-Synthase	Farnesylpyrophosphatsynthase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
Gimap	GTPase of the immunity associated protein
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GVHD	Graft-versus-Host diseases
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HMB-PP	Hydroxymethyl-Butenyl-Pyrophosphat
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
iNKT	invariante Natürliche Killer Zellen
IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
IPP	Isopentylpyrophosphat

II. Abkürzungsverzeichnis

iTreg	Induzierte regulatorische T-Zellen
MACS	Magnetic cell sorting
MHC	Major histocompatibility complex
MICA/B	MHC I-related chain A/B
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NKG2D	Natural killer group 2 member D
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nTreg-Zellen	Natürliche regulatorische T-Zellen
p53	Protein 53
Pag	Peptidische Antigene mit organischen Pyrophosphat
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Periphere blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PKC	Proteinkinase C
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
T-bet	T-Box transcription factor Tbx21
Tcons	Konventionelle T-Zellen
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktivatoren von $\gamma\delta$ T-Zellen ^{7,22}	16
Tabelle 2: Eingesetzte PCR Primersequenzen.....	42

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktureller Aufbau T-Zellrezeptor mit CD3 Molekülen	11
Abb. 2:	Stimulationsschema von PBMC Kulturen mit Zytokinen zur Anreicherung von potenziell immunsuppressiven V γ 9V δ 2 T-Zellen	31
Abb. 3:	Gating Strategie des Apoptoseassays mittels FlowJo am Beispiel des Peripherblutes eines repräsentativen, gesunden und freiwilligen Probanden (Q1:7AAD ⁺ , Annexin V ⁻ ; Q2:7AAD ⁺ , Annexin V ⁺ ; Q3:7AAD ⁻ , Annexin V ⁺ ; Q4:7AAD ⁻ , Annexin V ⁻)	44
Abb. 4:	Prozentualer Anteil V δ 2 T-Zellen an CD3 ⁺ Zellen in nativen und über 10 Tage stimulierten PBMC Kulturen am Beispiel eines repräsentativen Probanden in der FACS Analyse	45
Abb. 5:	Prozentualer Anteil V δ 2 T-Zellen an CD3 ⁺ Zellen in nativen (-) und über 10 Tage stimulierten (+) PBMC Kulturen.....	46
Abb. 6:	AnnexinV/7AAD Assay aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen. Abgebildet sind prozentuale Anteile lebender (Q4), nekrotischer (Q1) sowie früh (Q3) - und apoptotischer (Q2) $\alpha\beta$ T-Zellen. Die $\alpha\beta$ T-Zellen wurden mit nativen und über 10 Tage stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen bzw. in der jeweiligen Kontrollgruppe bestehenden aus reinen aktivierten PBMCs, kokultiviert. Es handelt sich um einen repräsentativen Probanden.	47
Abb. 7:	Prozentualer Anteil früh- und apoptotischer $\alpha\beta$ T-Zellen in Kokultur mit nativen (-) und über 10 Tage stimulierten (+) V γ 9V δ 2 T-Zellen; Daten erstveröffentlicht in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)	48
Abb. 8:	Prozentualer Anteil Gimap4+ V γ 9V δ 2 T-Zellen in nativen (-) und stimulierten (+) V γ 9V δ 2 T-Zellen	50
Abb. 9:	Gimap4 Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen in nativen und 10 Tage stimulierten PBMCs. Es ist das Expressionsmuster eines repräsentativen Probanden dargestellt.....	51
Abb. 10:	Korrelation zwischen der Gimap4 Expression und der in Kokultur induzierten Apoptose von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch native und über 10 Tage stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen....	52
Abb. 11:	Gimap4 mRNA Expression normalisiert zu GAPDH relativ zur Gimap4 Expression IL-15/IPP stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen. Untersucht wurden native (-) sowie verschiedenartig stimulierte (+) V γ 9V δ 2 T-Zellen.	53
Abb. 12:	Perforin und Granzyme B Expression (normalisiert zu GAPDH) relativ zur Perforin bzw. Granzyme B Expression IL-15/IPP stimulierter V δ 2 T-Zellen; Daten erstveröffentlicht in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)	56
Abb. 13:	Korrelation von der Granzyme B bzw. Perforin Expression mit der durch Kokultur induzierter Apoptoserate autologer $\alpha\beta$ T-Zellen durch native und über 10 Tage stimulierte V δ 2 T-Zellen; Daten erstveröffentlicht in: Cancer Immunol. Immunother. (2020) ..	58
Abb. 14:	Proliferation autologer CFSE markierter anti-CD3/CD28 aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen (dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierter $\alpha\beta$ T-Zellen an der Gesamtpopulation) nach 72h Kokultur mit verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen bzw. frisch isolierten PBMCs (Kontrolle). Es ist der Proliferationsassay eines repräsentativen Probanden dargestellt.	59
Abb. 15:	Suppression anti-CD3/CD28 aktivierter autologer $\alpha\beta$ T-Zellen nach 72h Kokultur mit nativen (-) bzw. stimulierten (+) V δ 2 T-Zellpopulationen. Als suppressive V δ 2 T-Zellpopulationen gilt eine Suppression > 50 %; Daten erstveröffentlicht in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)	60
Abb. 16:	FoxP3 Expression in nativen (-) und stimulierten (+) V δ 2 T-Zellen normalisiert zu GAPDH und relativ zur FoxP3 Expression IL-15/IPP stimulierter V δ 2 T-Zellen (A) und normalisiert zu GAPDH (B). (1) entspricht den Werten eines Probanden, der erhöhte Werte aufwies. Daten erstveröffentlicht in: Cancer Immunol. Immunother. (2020).....	63

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 17: Korrelation der FoxP3 Expression (zu GAPDH normalisiert) von nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellpopulationen und deren Suppression anti-CD3/CD28 aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen nach 72h Kokultur; Daten erstveröffentlicht in: Cancer Immunol. Immunother. (2020).....	65
Abb. 18: Korrelation vom Anteil Gimap4 ⁺ V δ 2 T-Zellen/Kultur mit der induzierten Suppression autologer anti-CD3/CD28 aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen nach 72h Kokultur	66
Abb. 19: IFN- γ Expression (normalisiert zu GAPDH) nativer (-) und 10-tägig stimulierter (+) V δ 2 T-Zellen.....	67
Abb. 20: Korrelation zwischen der IFN- γ Expression (GAPDH normalisiert) nativer und stimulierter V δ 2 T-Zellpopulationen und deren Anteil an Gimap4 ⁺ V δ 2 T-Zellen	68
Abb. 21: T-bet Expression in nativen (-) und stimulierten (+) V δ 2 T-Zellpopulationen normalisiert zu GAPDH relativ zur T-bet Expression IL-15/IPP stimulierter V δ 2 T-Zellen.....	69
Abb. 22: Korrelation von der IFN- γ und T-bet Expression (normalisiert zu GAPDH) in nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen.....	71
Abb. 23: Korrelation von der T-bet Expression (normalisiert zu GAPDH) und dem Anteil Gimap4 ⁺ V δ 2 T-Zellen in nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen	72
Abb. 24: Eomes Expression in nativen (-) und stimulierten (+) V δ 2 T-Zellpopulationen normalisiert zu GAPDH relativ zur Expression IL-15/IPP stimulierter V δ 2 T-Zellen	73
Abb. 25: Korrelation zwischen der Eomes und der T-bet Expression (normalisiert zu GAPDH).....	74
Abb. 26: Korrelation zwischen der Eomes Expression (normalisiert zu GAPDH) und dem Anteil Gimap4 ⁺ V δ 2 T-Zellen in nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen	75

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem

1.1.1 Grundlagen

Ohne das Immunsystem ist der Mensch nicht überlebensfähig; andererseits kann das Immunsystem viele Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen oder Allergien verursachen. Die überschießenden Reaktionen des menschlichen Immunsystems bekämpfen dann nicht nur pathologische Erreger wie Bakterien oder Viren, sondern auch gesunde körpereigene Strukturen. Erst ein funktionsfähiges und gesundes Immunsystem kann die Aufgabe bewältigen zwar die eigenen, individuellen Strukturen zu tolerieren, gleichzeitig jedoch die gefährlichen Krankheitserreger (Pathogene), denen der menschliche Organismus alltäglich ausgesetzt ist, abzuwehren. Es muss in der Lage sein, entartete körpereigene Zellen zu erkennen und zu bekämpfen. Bei Tolerierung dieser kann sonst eine bösartige Gewebsneubildung (Tumor) folgen. Weiterhin induziert das menschliche Immunsystem in entarteten Zellen und zur Selbstregulation in eigenen Immunzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) und baut unkontrolliert untergegangene Zellen (Nekrose) ab.

Das Immunsystem ist mit seiner Vielzahl an Funktionen ein System aus unterschiedlichen miteinander agierenden Komponenten, die sich den folgenden Kategorien zuordnen lassen: a) mechanische Schutzbarrieren wie die Haut, die Atemwege oder die Darmflora, b) zelluläre Bestandteile wie z. B. Makrophagen, Granulozyten oder T-Lymphozyten und c) humorale Bestandteile wie von B-Zellen gebildete Antikörper, das Komplementsystem oder die Interleukine.¹ Weiterhin sind lymphatische Organe wie das Knochenmark, der Thymus (primär lymphatische Organe), die Milz und die Lymphknoten (sekundär lymphatische Organe) an der Bildung und Differenzierung (primär) von Leukozyten oder an der Präsentation von Pathogenen (sekundär) beteiligt.

In der Reaktion des Immunsystems auf ein Pathogen kann zwischen der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunantwort unterschieden werden.² Zur angeborenen Immunantwort zählen mechanische Barrieren wie die

Haut und als zelluläre Bestandteile z.B. die Granulozyten, die unspezifisch Bakterien, Parasiten, Pilze und die von ihnen befallenen Körperzellen erkennen und phagozytieren können. Zwar ermöglicht die angeborene Immunantwort gegenüber den üblichen auftretenden Pathogenen eine schnelle und effektive Abwehr, hinsichtlich dem Körper unbekanntem Pathogenen besitzt sie jedoch eine geringere Spezifität. Die initiale adaptive Immunantwort verläuft wesentlich langsamer. Mit ihren zellulären Bestandteilen und einer spezifischen Antikörperbildung ist sie in der Lage, die Anpassungsfähigkeit des Immunsystems sicherzustellen und auch unbekannte Pathogene spezifisch zu eliminieren. Zu der adaptiven Immunantwort zählt weiterhin das immunologische Gedächtnis, das nach einer überstandenen Erstinfektion eine längerfristige (bis zu lebenslängliche) Immunität auf zellulärer Basis aufbaut. Die adaptive Immunität ermöglicht eine schnellere spezifische Immunantwort bei der erneuten Abwehr der von der Erstinfektion bereits bekannten Pathogene.

Erst das Zusammenspiel beider Immunantworten mit einer schnellen unspezifischen, angeborenen und einer langsameren spezifischen, adaptiven Komponente, stellt die Überlebensfähigkeit des menschlichen Organismus sicher.

1.1.2 Zelluläre Bestandteile des adaptiven Immunsystems

Die Zellen im Blut, die nicht wie die Erythrozyten den roten Blutfarbstoff Hämoglobin besitzen, werden weiße Blutzellen genannt (Leukozyten). Diese Zellen bilden den zellulären Bestandteil des Immunsystems und nehmen wichtige Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort wahr.

Leukozyten sind in allen Körpergeweben zu finden, bevorzugt aber im Blut und in den lymphatischen Organen wie Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz. Die Einteilung der Leukozyten erfolgt nach ihrer zellulären Abstammung aus der hämatopoetischen Stammzelle. Leukozyten der myeloiden Reihe, die alle der angeborenen Immunantwort zuzuordnen sind, lassen sich in Granulozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und Mastzellen weiter unterteilen. Sie entstammen hauptsächlich den im Knochenmark vorkommenden determinierten Stammzellen (Progenitorzellen), die gleichzeitig auch die Vorläuferzellen der Erythrozyten und Thrombozyten bilden. Die der lymphatischen Reihe zuzuordnenden Leukozyten wie die T- und B-Lymphozyten (kurz: T- bzw. B-Zellen) sowie natürliche

Killerzellen (NK-Zellen) haben ihren Ursprung dagegen in lymphoiden Vorläufern. NK-Zellen „killen“ unspezifisch und schnell Tumorzellen und virusinfizierte Zellen. Sie werden der angeborenen Immunantwort zugeordnet.³

Die T- und B-Zellen stellen dagegen die wichtigsten zellulären Elemente der adaptiven Immunantwort dar. T- wie B-Zellen entstammen den gleichen lymphoiden Vorläufern, erhielten ihre Namen jedoch von ihren unterschiedlichen Orten der Reifung. Während die B-Zellen im Knochenmark reifen, wandern Vorläuferzellen der T-Zellen in den Thymus und durchlaufen dort Reife- und Differenzierungsprozesse. Am Ende der Reifung im Thymus sind 98 % der (doppelt positiven) Thymozyten durch Selektion apoptotisch zugrunde gegangen und 2 % zu reifen, naiven T-Zellen differenziert.⁴ Die naiven T-Zellen wandern aus dem Thymus aus und zirkulieren im Blut bzw. in die sekundären Lymphorgane (Lymphgefäße, Milz etc.). Dort präsentieren ihnen die professionell Antigenpräsentierenden Zellen der Myeloiden Reihe Antigene, woraufhin sie nach der Differenzierung in Effektorzellen proliferieren, weiter differenzieren und ihre Funktionen als Immunzellen aufnehmen.

Nach der Selektion im Thymus sind die reifen, naiven T-Zellen immunkompetent. Immunkompetente T-Zellen können körperfremde Moleküle, die ihnen über major histocompatibility complex (MHC) Moleküle präsentiert werden, als fremd erkennen und sind gleichzeitig körpereigenen Strukturen gegenüber tolerant (zentrale Toleranz). MHCs sind höchst polymorphe Glykoproteine (mit einer großen genetischen Variation), die in die MHC-Klassen I, II, und III unterteilt werden.⁵ MHC I wird von allen kernhaltigen Körperzellen auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Sollte die jeweilige Körperzelle virusinfiziert sein oder tumorartige Veränderungen aufweisen, dann können T-Zellen anhand der auf dem MHC I präsentierten fremdartigen Peptidfragmenten des Antigens die befallene Zelle erkennen und eliminieren. MHC II dagegen wird neben aktivierten T-Zellen auch auf Antigenpräsentierenden Zellen (APCs; dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen) exprimiert. APCs kommen in allen Körpergeweben vor und phagozytieren Fremdkörper. Die aufgenommenen Fremdkörper werden zu Antigenbruchstücken prozessiert und auf der Zelloberfläche der APCs mittels MHC II wiederum den T-Zellen präsentiert. Den APCs zugehörig stellen B-Zellen eine Besonderheit dar, da diese über ihren B-Zell Rezeptor (BZR) Antigene binden und anschließend die Antigene über MHC II Typ2-T-Helferzellen (kurz: T_H2 Zellen) präsentieren. Nachfolgend differenzieren die wie oben beschrieben

aktivierten B-Zellen zu antikörperbildenden Plasmazellen, die spezifische Antikörper gegen die Antigene bilden und ausschütten. Ein kleiner Teil der aktivierten B-Zellen differenziert zu Gedächtnis-B-Zellen, die zurück in das Knochenmark wandern und das Grundgerüst des immunologischen Gedächtnisses bilden. Das MHC III ist im Gegensatz zu MHC I und II nicht der adaptiven, sondern der angeborenen Immunantwort zuzuordnen. Dazu gehören weiterhin die Moleküle des Komplementsystem, Akute-Phase Proteine und proinflammatorische Proteine wie Interleukine (IL) und Interferone.

1.1.3 Oberflächenmoleküle von T-Zellen

1.1.3.1 T-Zellrezeptor

Mit Hilfe des T-Zellrezeptors (TZR) erkennen T-Zellen, die ihnen über MHC Moleküle präsentierten, kurzen Peptidfragmente eines Proteins. Der TZR ist ein Heterodimer, das sich aus zwei Polypeptidketten zusammensetzt. Die zwei Polypeptidketten bestehen aus je einer extrazellulären konstanten sowie variablen Region, einer Transmembranregion und einem kurzem zytoplasmatischen Anteil. Verbunden sind die beiden Polypeptidketten mit einer Disulfidbrücke in der konstanten Region.

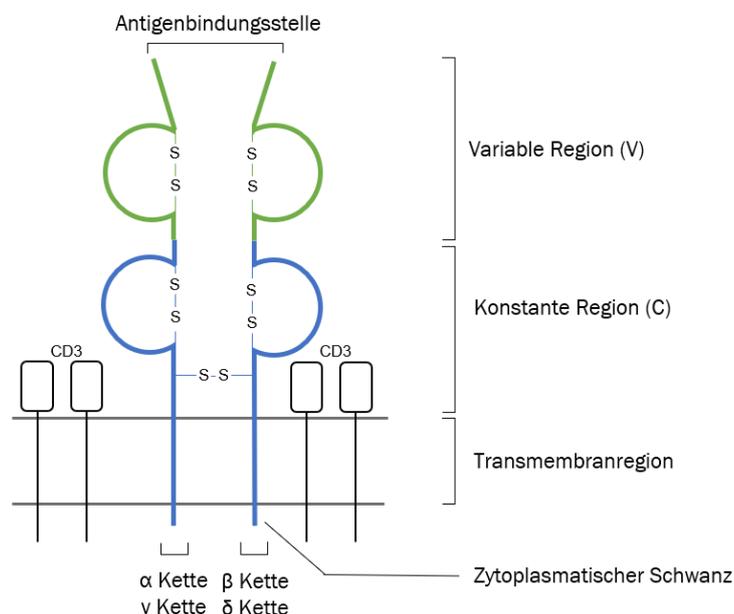


Abb. 1: Struktureller Aufbau T-Zellrezeptor mit CD3 Molekülen

Anhand des Typs der auf ihrer Zelloberfläche exprimierten Polypeptidketten des TZRs lassen sich die T-Zellen in zwei Gruppen einteilen: Die allgemein bekannteren $\alpha\beta$ T-Zellen besitzen ein Heterodimer, das sich aus einer α und einer β Kette aufbaut; die

weniger untersuchten $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen ein $\gamma\delta$ Heterodimer als TZR, das aus einer γ und einer δ Kette besteht. Wie bei dem $\alpha\beta$ TZR lassen sich die γ - und δ -Ketten des $\gamma\delta$ TZR in weitere Subtypen unterteilen: Es gibt 8 δ Segmente, von denen $V\delta 1$, $V\delta 2$ und $V\delta 3$ die am häufigsten im Menschen vorkommenden sind (es existieren 5 weitere seltenere δ -Ketten: $V\delta 4/TRA V14$, $V\delta 5/TRA V29$, $V\delta 6/TRA V23$, $V\delta 7/TRA V36$ und $V\delta 8/TRA V38$, die als Substitut für eine α Kette im $\alpha\beta$ TZR dienen können). Für die γ -Ketten sind 7 bekannte Segmente für ein Rearrangement verfügbar: $V\gamma 2$, $V\gamma 3$, $V\gamma 4$, $V\gamma 5$, $V\gamma 8$, $V\gamma 9$ und $V\gamma 11$ (5 weitere nicht verwendete Gensegmente finden sich auf dem γ -Locus auf Chromosom 7).⁶

Im Gegensatz zu $\gamma\delta$ T-Zellen unterliegen $\alpha\beta$ T-Zellen einer MHC-Restriktion. D.h. Antigene können ihnen nur MHC vermittelt präsentiert werden. $\gamma\delta$ T-Zellen unterliegen nicht der MHC Restriktion und können freie Antigene erkennen.⁷

1.1.3.2 Korezeptoren von T-Zellen

Der T-Zellrezeptor ist stets mit einem zu der Immunglobulin-Superfamilie gehörigen Proteinkomplex CD3 (CD: Cluster of Differentiation) assoziiert. Neben CD3 sind mehr als 400 CD-Moleküle bekannt, die meist als Glykoproteine auf der Zelloberfläche exprimiert, vielfältigste Funktionen einnehmen.⁸ CD3 wird nur von T-Zellen exprimiert und wird deshalb als „lineage“ Marker für T-Zellen bezeichnet. Nach der Erkennung eines Antigens durch den TZR erfolgt mit der Phosphorylierung des intrazellulären Anteils des CD3 der Beginn der Signalkaskade der T-Zellaktivierung.

Neben dem CD3 Komplex benötigen $\alpha\beta$ T-Zellen zur Antigenerkennung einen Korezeptor. Die Transmembranproteine CD4 und CD8 zählen ebenfalls zu den CD-Molekülen und nehmen als Korezeptoren für den $\alpha\beta$ TZR eine entscheidende Rolle bei der Erkennung der MHC vermittelten Antigenpräsentation ein: $CD4^+$ T-Zellen erkennen Antigene über MHC II, $CD8^+$ T-Zellen über MHC I.

Bei $CD4^+$ T-Zellen wird zwischen T-Helferzellen (T_H) und cytotoxischen T-Zellen unterschieden. T_H lassen sich in T_H1 , T_H2 , T_H9 , T_H17 , T_H21 und weitere T-Helferzelltypen einteilen. Während T_H1 -Zellen direkte, meist zytolytische Immunantworten vermitteln, agieren T_H2 -Zellen mit B-Zellen und steuern die humorale Immunantwort. Zytotoxische T-Zellen dagegen sind meist $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen, die mittels MHC I infizierte, sowie entartete körpereigene Zellen erkennen und

abtöten. Zwar existieren auch doppelt positive $\alpha\beta$ T-Zellen, die als heterogene Gruppe jedoch eine exklusive Rolle im Immunsystem einnehmen.⁹

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen tragen ca. 70-80 % der peripheren $\gamma\delta$ T-Zellen weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche, 20-30 % sind CD8⁺ und nur weniger als 1 % CD4⁺.¹⁰ Dies ist dadurch zu erklären, dass $\gamma\delta$ T-Zellen MHC unabhängig Antigene erkennen, da hierfür die Expression einer der beiden Korezeptoren CD4 oder CD8 nötig wäre (keine MHC Restriktion).¹¹

Ein weiterer zu erwähnender Marker, der mit der Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Treg-Zellen) verbunden ist, ist CD25 (α Kette des IL-2 Rezeptors). Dieser wird wie der Transkriptionsfaktor FoxP3 konstitutiv auf aus dem Thymus abstammenden natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg-Zellen) exprimiert.

Das Transmembranprotein CD28 wird dagegen von T-Zellen und Plasmazellen exprimiert. Als Korezeptor des TZR wird CD28 zur T-Zellaktivierung benötigt. So führt eine anti-CD3/28 Stimulation von $\alpha\beta$ T-Zellen zu einer starken Aktivierung mit folgendem Proliferationssignal innerhalb der Zelle. Mit anti-CD3/28 stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen proliferieren ebenfalls, jedoch ist die Proliferationsrate im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen deutlich abgeschwächt.¹²

1.1.4 $\gamma\delta$ T-Zellen

1.1.4.1 Grundlagen

$\gamma\delta$ T-Zellen bilden mit 2-20 % eine Minderheit der im Blut vorkommenden T-Zellen.^{13,14} Der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen kann sich individuell stark unterscheiden und während Infektionen (virale Infektionen sowie Tuberkulose, Malaria, Toxoplasmose, Brucellose, Leishmaniose, Tularämie und Listeriose), entzündlichen Erkrankungen (Sarkoidose und Autoimmunerkrankungen) oder Bluterkrankungen bis zu 60 % der CD3⁺ Zellen im Blut für bis zu 4 Monate ausmachen.^{15,16} In den epithelialen Geweben wie der Mukosa des Gastrointestinaltraktes oder der Haut tragen dagegen physiologischerweise bis zu 50 % der T-Zellen einen $\gamma\delta$ TZR.¹⁷ Während im Blut 80-90 % der $\gamma\delta$ T-Zellen eine V δ 2 Kette mit einer V γ 9 Kette als TZR aufweisen, besitzen in epithelialen Geweben die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen einen TZR mit einer V δ 1 Kette und einer dazu vorzugsweise gepaarte V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, oder V γ 8 Kette. Die in der Haut von adulten Tieren, nicht aber in der menschlichen Haut vorkommenden als dendritische epidermale T-Zellen

(DETC) bezeichneten $\gamma\delta$ T-Zellen, exprimieren dagegen einen monomorphen TZR.^{18,19} Die tatsächliche Diversität der TZRs von V δ 1 und V δ 2 T-Zellen ist verglichen zu den polymorphen $\alpha\beta$ TZRs jedoch eher gering.

Beide Subtypen der $\gamma\delta$ T-Zellen agieren als eine Brücke zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort.²⁰ Einerseits besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen Merkmale, die der angeborenen Immunantwort zuzuordnen sind: die begrenzte Diversität der $\gamma\delta$ TZRs sowie die Fähigkeit von $\gamma\delta$ TZRs als Teil eines alten angeborenen Abwehrmechanismus Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) zu erkennen, sind typisch für angeborene Immunantworten.²¹ Beide Subtypen der $\gamma\delta$ T-Zellen können gegenüber Pathogenen eine natürliche Abwehr aufbauen und gehören zur „*First line of defense*“.²² Weiterhin zeigen $\gamma\delta$ T-Zellen auf mikrobielle Infektionen eine schnelle Immunantwort, rekrutieren andere Effektorzellen, phagozytieren degenerierte und infizierte Zellen und präsentieren Fremdpeptide/mutierte Selbstpeptide wie professionelle APZ den $\alpha\beta$ T-Zellen.²³ Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen erkennen $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch keine Fremdpeptide (molekulare Strukturen körperfremder Antigene), sondern mit Ausnahmen ausschließlich Selbstpeptide.²⁴

Typisch für eine adaptive Immunantwort können V γ 9V δ 2 T-Zellen andererseits einen Gedächtnisphänotyp mit der Expression des Gedächtnis-T-Zell-Marker CD45RO auf ihrer Zelloberfläche aufweisen.²⁵ Die Fähigkeiten der V γ 9V δ 2 T-Zellen in T_H1 oder T_H2 Phänotypen zu differenzieren sowie mittels der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Zytokine, die Chemotaxis initiieren) die adaptive Immunantwort zu regulieren, deuten an, dass V γ 9V δ 2 T-Zellen eine Schlüsselfunktion in der Formung adaptierter Immunantworten haben.^{26,27} Weiterhin erweitern $\gamma\delta$ T-Zellen als doppelt negative CD4⁻ CD8⁻ T-Zellen mit MHC unabhängiger Antigenerkennung, das mögliche Antigenespektrum des Immunsystems. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den Immunrezeptor NKG2D, dessen Liganden MICA/B oft von Tumorzellen und infizierten Zellen hochreguliert werden. NKG2D erkennt und lysiert verschiedene Tumorentitäten (epitheliale Tumore gelten hierbei als geeignete Ziele für T-Zell basierte Immuntherapien).²⁸ Es wird daher angenommen, dass Natürliche-Killer-Zell-Rezeptoren (NKRs) wie NKG2D die Tumorzellerkennung von $\gamma\delta$ T-Zellen vermitteln.²⁹ Der Immunrezeptor NKG2D gehört zum Repertoire von $\gamma\delta$ T-Zellen, invarianten Natürlichen Killer Zellen (iNKT), NK Zellen und CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen.³⁰

1.1.4.2 Aktivierungsmechanismen

Durch CD1 präsentierte Glykolipide können V δ 1 T-Zellen TZR vermittelt aktiviert werden.³¹ Eine spezifische Aktivierung der in der Peripherie dominierenden V γ 9V δ 2 T-Zellen erfolgt dagegen durch nicht-peptidische Antigene, welche sich folgenden drei Gruppen zuordnen lassen: (1) Alkylphosphate, (2) Alkylamine und (3) synthetische Aminobisphosphonate.²² Zu den Posphoantigenen (nicht peptidische Antigene mit organischen Pyrophosphat (z. B. Alkylphosphate); PAg) gehört Isopentenylpyrophosphat (IPP). IPP wird von vielen Pro- und Eukaryonten als Endprodukt des klassischen Mevalonatweges zur Cholesterin- und Steroidbiosynthese gebildet. Die Überexpression von IPP in z. B. Tumorzellen oder infizierten Zellen triggert eine suffiziente V γ 9V δ 2 T-Zellproliferation.²² Darüber hinaus können einige Eukaryonten und Pflanzen über einen alternativen Mevalonatstoffwechselweg IPP synthetisieren. Der dabei entstehende Zwischenmetabolit Hydroxymethyl-Butenyl-Pyrophosphat (HMB-PP) ist ein wesentlich potenterer (1000 - 10000-fach) V γ 9V δ 2 T-Zellaktivator als IPP.²² V γ 9V δ 2 T-Zellen können daher von Pathogenen wie dem Bakterium *Listeria monocytogenes*, die HMB-PP synthetisieren, unter der Wirkung von HMB-PP in vivo stark aktiviert werden.³² Phosphoryliertes Bromohydrin (BrHPP, Phosphostim), welches spezifisch V γ 9V δ 2 T-Zellen stimuliert und wesentlich stabiler als IPP ist, ist eine weitere Alternative bei der V γ 9V δ 2 T-Zellstimulation, auch im klinischen Kontext.³³ Synthetische Aminobisphosphonate, die z.B. für die Behandlung von Osteoporose zugelassen sind (Zoledronat (Zometa)) führen durch die Inhibierung der Farnesylpyrophosphatsynthase (FPP-Synthase) zu einer Anreicherung von IPP innerhalb der V γ 9V δ 2 T-Zellen mit der im folgenden beschriebenen BTN3A1 vermittelten V γ 9V δ 2 T-Zellaktivierung.³⁴

Tabelle 1: Aktivatoren von $\gamma\delta$ T-Zellen^{13,29}

Liganden	Subpopulation
MICA/MICB	V δ 1 Klone
CD1-Sulfate	V δ 1
HLA-A24, HLA-A2	V δ 1
HLA-B27	V γ 4V δ 1
Histidyl-tRNA synthetase	V γ 3V δ 2
Alkylamine	V γ 9V δ 2
F1 ATPase, Apo A-I	V γ 9V δ 2
Hsp60, Hsp65	V γ 9V δ 2
Phosphoantigene, Aminobisphosphonate	V γ 9V δ 2
ULBP40	V γ 9V δ 2
EPCR	V γ 4V δ 5

Der molekulare Ablauf der TZR vermittelten Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch PAgS wie IPP oder BrHPP ist inzwischen aufgeklärt: Das Transmembranprotein Butyrophilin (BTN) 3A1 (Isoform von BTN3A/CD277) spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen. Eine Akkumulation von PAgS innerhalb der Zelle induziert, vermittelt über die intrazelluläre Signaldomäne B30.2 von BTN3A1, Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen von BTN3A1. Aufgrund der Stabilisierung von BTN3A1 in der Membran durch die Anlagerung von RhoB in der GTP gebundenen Form und der Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen wird BTN3A1 nachfolgend für den V γ 9V δ 2 TZR erkennbar.^{35,36} Sebestyen et al. beschrieben die GTPase Aktivität von RhoB dabei als wichtigen Modulator der V γ 9V δ 2 TZR Aktivierung.³⁵ Man geht davon aus, dass ein jedoch noch nicht identifizierter Faktor X involviert ist, der die Bindung stabilisiert und sie so erst triggerfähig macht.

Nach der indirekten Aktivierung durch PAgS produzieren V γ 9V δ 2 T-Zellen nur geringe Mengen des Interleukins IL-2. Zur Proliferation sind daher V γ 9V δ 2 T-Zellen auf eine exogene Zufuhr des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 angewiesen. Daneben kann IL-15 als T- und NK-Zellaktivator zu einer deutlichen Proliferationssteigerung führen.³⁷ Der ebenfalls sehr potente T-Zellaktivator IL-12 konnte bei zusätzlicher Anwesenheit bei

der Aktivierung durch Bisphosphonate (Ibandronat, Pamidronat oder Zoledronat) die Proliferation der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen dagegen nicht weiter steigern.³⁸ Das antiproliferative Zytokin Transforming Growth Factor beta (TGF- β) hat einen leicht negativen Einfluss auf die Proliferationsrate von aktivierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.³⁹

1.1.4.3 Zytotoxische Eigenschaften

Aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen unterteilen sich bzgl. ihren Funktionen in Effektor $\gamma\delta$ T-Zellen mit zytotoxischen Eigenschaften und $\gamma\delta$ Suppressor-T-Zellen ($\gamma\delta$ Treg-Zellen) mit immunmodulierenden Eigenschaften.⁴⁰

Aktivierte $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen produzieren große Mengen der T_H1 typischen Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).⁴¹ IFN- γ aktiviert Makrophagen und hat eine antivirale wie antitumorale Wirkung. Das von $\gamma\delta$ T-Zellen sekretierte IFN- γ scheint durch die Regulation von Tumor-getriggerten $\alpha\beta$ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Tumormunität einzunehmen.⁴² Die Anwesenheit von IL-12 bei der Aktivierung steigert die Expression des Transkriptionsfaktor STAT4 (gezeigt für $\gamma\delta$ T-Zellen) und vermittelt dadurch die IFN- γ Produktion (gezeigt für $CD4^+$ FoxP3⁺ Treg-Zellen).⁴³⁻⁴⁶ Das Zytokin TNF- α stimuliert in Makrophagen die Phagozytose, moduliert lokal die Entzündung und kann Apoptose in Zellen einleiten.

Als ein Marker für die Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit T_H1 Phänotyp kann der Transkriptionsfaktor Eomesodermin (Eomes) gelten.⁴⁷ Eomes wird vom Transkriptionsfaktor T-Box transcription factor Tbx21 (T-bet) abhängig exprimiert. Beide sind wichtig in der Regulation von zytotoxischen Zellen wie NK und $CD8^+$ Zellen sowie in der Effektor- und Gedächtniszellentwicklung. In $CD4^+$ Zellen induziert Eomes IFN- γ , Perforin, und Granzyme B und fördert damit einen zytotoxischen Phänotyp.⁴⁷ In Anwesenheit von IL-2 exprimieren über ihren TZR aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen Eomes und T-bet. Die zusätzliche Anwesenheit von IL-12 und IL-15 fördert die Expression von Eomes und T-bet.^{48,49} Ein besonders hohes Eomes Expressionsniveau lässt sich jedoch auch bei erschöpften $\gamma\delta$ T-Zellen finden.⁴⁷

Neben diesem T_H1 typischen Phänotyp können aktivierte $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen einen T_H2 typischen Phänotyp mit Sekretion von IL-4 und IL-10 zeigen.⁵⁰ IL-4 und IL-10 wirken antiinflammatorisch und haben einen negativen regulatorischen Effekt auf $\gamma\delta$ T-Zellen.^{51,52} Durch die Sekretion von IL-10 hemmen $\gamma\delta$ T-Zellen weiterhin die TNF- α Produktion von aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen.⁵³

Neben eher T_H1 sowie T_H2 typischen regulatorischen Funktion zeigen Effektor $\gamma\delta$ T-Zellen weiterhin eine eigene sowie zellvermittelte Zytotoxizität. In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Apoptose-induzierender Effekt von mit IPP aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen auf $\alpha\beta$ T-Zellen beobachtet. Im Folgenden werden daher bereits bekannte zytotoxische Mechanismen von $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben.

Aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen sezernieren die zytolytisch wirksamen Proteine Perforin und Granzyme B. Perforin bildet Poren in der Membran der Zielzellen und ermöglicht der Serinprotease Granzyme B in das Zytoplasma der Zielzelle einzudringen und dort die Caspase 3 zu aktivieren. Der dem folgende Abbau der Desoxyribonukleinsäure (DNA) leitet die Apoptose der Zielzelle ein. Weiterhin regulieren mit Zoledronat stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen den Fas Ligand (FasL) und den Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Ligand (TRAIL) hoch, welche ebenfalls durch „Todesrezeptoren“ (death receptor) an der Zelloberfläche der Zielzellen Apoptose induzieren können. Nach 14-tägiger Stimulation mit Zoledronat zeigten $\gamma\delta$ T-Zellen eine TRAIL, FasL, Perforin und Granzyme B vermittelte signifikante Zytotoxizität gegenüber Daudi Zellen.⁵⁴

Neben funktionellen Parallelen der $\gamma\delta$ T-Zellen mit NK Zellen auf der Genomebene, regulieren $\gamma\delta$ T-Zellen die von NK Zellen ausgehende Zytotoxizität.^{55,56} So konnten mit IPP und IL-2 aktivierte $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen durch zellkontaktabhängige CD137 (bekannt unter 4-1BB, negativ inotroper Rezeptor auf $\alpha\beta$ T-Zellen) Interaktionen eine NK-Zell-vermittelte Tumor Zytotoxizität induzieren.⁵⁶ Die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen durch proinflammatorische Zytokine, Phagozytose, Trogozytose vermittelte Antigenpräsentation, antikörper-vermittelte („antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“ kurz ADCC) und NK Zellrezeptor vermittelte Zytotoxizität ist bereits reichlich gezeigt worden.^{39,40,57}

1.1.4.4 Immunregulatorische Eigenschaften

In der Immunregulation, die die Autoimmuntoleranz und die Immunhomöostase des Immunsystems aufrechterhält, nehmen $\alpha\beta$ Treg-Zellen (klassische Treg Zellen) gegenüber den $\gamma\delta$ Treg-Zellen eine übergeordnete Rolle ein. $\alpha\beta$ Treg-Zellen sind dem adaptiven Immunsystem zuzuordnen und regulieren T-Zell mediierte Immunantworten, indem sie diese supprimieren und nach erfolgreicher Immunantwort beenden. Sie hemmen die Proliferation und Effektorfunktionen von

Lymphozyten, Monozyten und dendritische Zellen und regulieren die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1 , T_H2 oder T_H17 -Zellen.⁵⁸ Als Marker für $\alpha\beta$ Treg-Zellen galt früher der Transkriptionsfaktor FoxP3, da die Suppressoraktivitäten der $\alpha\beta$ Treg-Zellen stabile FoxP3 Expressionen bedingen.^{59,60} Für $\alpha\beta$ Treg-Zellen von Mäusen gilt diese Annahme weiterhin, für Menschen jedoch nicht mehr.⁶¹

$\alpha\beta$ Treg-Zellen werden in zwei Subtypen unterschieden: (1) natürliche im Thymus generierte Treg-Zellen (nTreg-Zellen) mit hohen FoxP3 Expressionen, (2) in der Peripherie mit Anwesenheit von IL-10 aus $CD4^+ CD25^-$ T-Zellen induzierte Treg-Zellen (iTreg-Zellen) mit hohen CD25, FoxP3 und CTLA-4 Expressionen.⁶² Dennoch existieren auch FoxP3⁻ iTreg-Zellen.⁶³ Die Subtypen werden durch die Expression des Transkriptionsfaktor Helios voneinander unterschieden (nTreg-Zellen exprimieren Helios, iTreg-Zellen zeigen ein deutlich geringeres Helios Expressionsniveau).⁶⁴ Die Suppressoraktivität der nTreg-Zellen ist vom Zellkontakt abhängig, die der iTreg-Zellen erfolgt zellkontaktunabhängig über die Ausschüttung von proliferationshemmenden Zytokinen wie TGF- β , IL-10 und IL-35.^{65,66} Ein weiterer zellkontaktunabhängiger immunsuppressiver Mechanismus von $\alpha\beta$ Treg-Zellen ist die Hydrolyse von extrazellulärem ATP zu ADP oder AMP durch die ATPase CD39 (Ectonukleosidtriphosphat-diphosphohydrolase 1), welche auf der Oberfläche exprimiert wird. Da extrazelluläres ATP Entzündungsprozesse vermittelt, trägt die Expression von CD39 zu einem antientzündlichen Umfeld bei.^{67,68} Zu den zellkontaktabhängigen Suppressionsmechanismen der $\alpha\beta$ Treg-Zellen gehören dagegen CD80/CTLA-4 Interaktionen zwischen $\alpha\beta$ Treg-Zellen und konventionelle T-Zellen (Tcons), die die Proliferation der Tcons absenkt. Der Transport von cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) über gap junctions zwischen $\alpha\beta$ Treg-Zellen und Tcons stellt einen weiteren zellkontaktabhängigen immunsuppressiven Mechanismus der $\alpha\beta$ Treg-Zellen dar.^{69,70} Eine überhöhte Anwesenheit von cAMP in Tcons führt neben der Inhibition von proliferationsfördernden Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ zur Anergie der Tcons. Auch unterbrechen $\alpha\beta$ Treg-Zellen direkt über den TZR induzierte Proliferationssignale in Tcons.⁷¹ Ein indirekter Mechanismus der Suppression von Tcons erfolgt über die Regulation der Aktivierung von APCs durch $\alpha\beta$ Treg-Zellen, wodurch die APC vermittelte Aktivierung von Tcons gehemmt wird.⁵⁸ Neben suppressiven Funktionen wurde bereits auch eine Perforin/Granzyme vermittelte Zytotoxizität gegenüber autologen Tcons für $\alpha\beta$ Treg-Zellen beschrieben.⁷²

Nichtsdestotrotz ist die von $\gamma\delta$ Treg-Zellen ausgehende Immunsuppression für die Feinjustierung der Immunregulation wichtig.^{73,74} In $\gamma\delta$ T-Zellen-defizienten Mäusen wurde bereits früh beobachtet, dass wenn diese mit *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Klebsiella* infiziert waren, sie überschießende $CD4^+$ $\alpha\beta$ T-Zellzahlen/antworten und erhöhte Entzündungszeichen aufwiesen.⁷⁵ Diese Beispiele von dysregulierten Immunantworten in $\gamma\delta$ T-Zellen-defizienten Mäusen verdeutlichen, dass in Mäusen $\gamma\delta$ T-Zellen $\alpha\beta$ T-Zellantworten herunterregulieren können. Da sich jedoch der strukturelle Aufbau des $\gamma\delta$ TZR zwischen Mensch und Maus unterscheidet, ist die direkte Übertragung von Beobachtungen bzgl. der Liganden von $\gamma\delta$ T-Zellen in Mäusen (im Gegensatz zu Alpacas, als einziger nicht-Primat) auf den Menschen schwierig.⁷⁶ Dennoch stellten die Beobachtungen in Mäusen die ersten beschriebenen Indizien für die Existenz von humanen $\gamma\delta$ T-Zellen mit regulatorischen Funktionen dar.

Für den Menschen zeigten Patel et al. bereits 1989 eine von humanen $\gamma\delta$ T-Zellklonen ausgehende Immunregulation, bei der eine von $CD4^+$ T-Zellen induzierte Differenzierung von B-Zellen supprimiert wurde.^{73,77} Seitdem wurden einige suppressive Mechanismen von $\gamma\delta$ Treg-Zellen beobachtet, die häufig denen der $\alpha\beta$ Treg-Zellen entsprechen. Für das $V\delta 1$ T-Zellsubset von Tumorpatienten wurde eine Suppression von T-Zellantworten, die durch TLR (Toll-like-Rezeptor) Antagonisten aufgehoben werden konnte, gezeigt.⁷⁸ TLRs gehören der angeborenen Immunantwort an und erkennen PAMPs. Auch die Suppressivität von $\alpha\beta$ Treg-Zellen wird durch eine TLR Stimulation verstärkt.⁷⁹ Die gleiche Arbeitsgruppe um Peng et al. konnte weiterführend zeigen, dass dieselben $\gamma\delta$ T-Zellen Seneszenz (Zellzyklusarrest) in $CD4^+$ T-Zellen und dendritischen Zellen induzieren.⁸⁰ Äquivalent zu $\alpha\beta$ Treg-Zellen schütten $\gamma\delta$ Treg-Zellen die Zytokine TGF- β und IL-10 aus und hemmen dadurch das Wachstum anderer T-Zellpopulationen.⁸¹ Ca. 50 % der $\gamma\delta$ Treg-Zellen (vornehmlich $V\delta 1$ T-Zellen) sind $CD39^+$ und tragen durch die Hydrolyse von extrazellulären ATP ähnlich der $\alpha\beta$ Treg-Zellen zu einem antientzündlichen Umfeld bei. Gleichzeitig zeigen $CD39^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen eine stärkere suppressive Kapazität gegenüber Tcons.⁸² Auch der Wettbewerbsvorteil um das proliferationsfördernde Zytokin IL-2 aufgrund einer höheren Affinität zu IL-2 (höhere Expression der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors CD25 auf der Zelloberfläche von $\gamma\delta$ Treg-Zellen) als Tcons führt zu einer indirekten Immunsuppression und zur Apoptose anderer T-Zellpopulationen.⁸³

Für aus PBMCs generierte V γ 9V δ 2 Treg-Zellen beschrieben 2009 und 2010 Casetti et al. und Traxlmayr et al. unabhängig voneinander immunsuppressive Wirkungen auf autologen PBMCs bzw. $\alpha\beta$ T-Zellen.⁷⁴ Casetti et al. gingen von einer FoxP3⁺ vermittelten Suppression der V γ 9V δ 2 T-Zellen auf anti-CD3/28 aktivierte autologe PBMCs aus, die zellkontaktabhängig und nicht Zytokin vermittelt war. Die stärkste suppressive Wirkung zeigte sich bei einem Effektor-/ Zielzellen-Verhältnis von 1:1.⁸⁴ Traxlmayr et al. untersuchten aufgrund einer geringeren CD25 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen die immunregulatorische Wirkung auf $\alpha\beta$ T-Zellen. Frische, über ihren TZR positiv isolierte V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigten, obwohl sie nur zu 1 % FoxP3 exprimierten, eine immunsuppressive Wirkung auf das Wachstum von CD4⁺ T-Zellen.¹² 2014 belegten Peters et al., dass die suppressive Funktion von aktivierten V γ 9V δ 2 T-Zellen nicht wie Casetti et al. erst vermuteten mit der FoxP3 Expression korreliert. FoxP3 kann daher nicht als Marker für $\gamma\delta$ Treg-Zellen gelten. Stattdessen hypothetisierten Peters et al. die inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 als mögliche Wirkmechanismen. In der MLC von V γ 9V δ 2 T-Zellen mit Zielzellen, regulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen CD86 und PDL-1 hoch sowie dazu kongruent die Zielzellen CTLA-4 und PD-1.³⁹ Auch Casetti et al. zeigten, dass CTLA-4 durch aktivierte V γ 9V δ 2 T-Zellen hochreguliert wird. CTLA-4 wird auf der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert und führt nach der Interaktion mit CD80 oder CD86 zu einem proliferationshemmenden Signal innerhalb der Effektorzelle. Der Oberflächenrezeptor PD-1, dessen Ligand PDL-1 ist, verhindert die T-Zellaktivierung und hat ebenfalls eine negative immunmodulierende Wirkung. Peters et al. folgerten daher anhand der beobachteten Mechanismen, dass $\gamma\delta$ Treg-Zellen zu den auf aktivierten T-Zellen exprimierten Checkpoint Rezeptoren eine feinjustierende immunsupprimierende Rolle in der Regulierung der $\alpha\beta$ T-Zell-vermittelten Immunantwort durch die Expression von negativ inotropen stimulierenden Liganden einnehmen.³⁹

1.1.4.5 Klinische Bedeutung

Seit der Entdeckung der zytotoxischen Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen steht die klinische Anwendung in Form von zellbasierten Immuntherapien im Mittelpunkt der $\gamma\delta$ T-Zellforschung.^{78,85-91} Die in vivo Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen oder Infusion von ex vivo stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ist zwar eine sichere und gut tolerierte Therapie, jedoch

zeigten sie bisher eher gemischte Ergebnisse mit einer geringen Effektivität.⁹² Neben ihrer Tumor Zytotoxizität haben $\gamma\delta$ T-Zellen auch tumorfördernde Effekte z.B. die IL-17 vermittelte Förderung der Angiogenese von Tumoren.⁹³ Auch die immunsuppressive Wirkung von $\gamma\delta$ Treg-Zellen verstärkt eher das Tumorwachstum.⁹⁴ Diese tumorfördernden Effekte werden als Ursache für die geringen Effektivität von $\gamma\delta$ -T-Zelltherapien bei Krebspatienten angenommen.⁹⁵

$\gamma\delta$ T-Zellen induzieren selber keine Graft-versus-host Disease (GvHD), eine nach allogenen Blutstammzell- oder Knochenmarktransplantationen auftretende systemische entzündliche Erkrankung.^{85,96} In der Therapie der GvHD dagegen könnte die Expansion von $\gamma\delta$ Treg-Zellen des Empfängers vielversprechend sein.⁹⁷ Auf der Graft Seite zeigten sich jedoch GvHD fördernde Effekte bei hohen $\gamma\delta$ -T-Zellanzahlen im Transplantat.^{98,99}

1.2 FoxP3

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor der zu der eigenständigen Familie der Forkhead/winged-helix Transkriptionsfaktoren gehört. Als Marker der regulatorisch wirksamen $\alpha\beta$ Treg-Zellen ist die Expression von FoxP3 für deren Entwicklung im Thymus von elementarer Bedeutung.¹⁰⁰ Bei einer ähnlichen Sequenzabfolge von FoxP3 bei Maus und Mensch korreliert in der Maus die FoxP3 Expression streng mit der regulatorischen Aktivität der $\alpha\beta$ Treg-Zellen. Im Menschen muss FoxP3 als Marker für regulatorische Funktionen jedoch neu überdacht werden.¹⁰¹ In klassischen $\alpha\beta$ Treg-Zellen ist die FoxP3 Expression auf der mRNA Ebene kein sicherer Marker für $\alpha\beta$ Treg-Zellen, sondern resultiert eher als eine Konsequenz der Aktivierung.⁶¹ Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde das von FoxP3 abhängige Zelloberflächenmolekül GARP, welches sich zusammen mit anderen Zelloberflächenmolekül als wesentlich spezifischerer Marker für $\alpha\beta$ Treg-Zellen herausstellte, gefunden.^{102,103} Nichtsdestotrotz führen Mutationen im Gen von FoxP3 zum IPEX Syndrom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked), welches unbehandelt im ersten Lebensjahr tödlich endet und Symptome einer Fehlregulation des Immunsystems wie Ekzeme, Diabetes mellitus Typ 1, Neurodermitis und rezidivierende Infektionen aufweist.

Als Transkriptionsfaktor interagiert FoxP3 direkt mit anderen Transkriptionsfaktoren und reguliert aktiv durch die Bindung in der Promoterregion der Zytokine IL-2 und IFN- γ deren Transkription.³⁹ Als transkriptioneller Repressor dieser sowie durch die Interaktion mit dem nuclear factor of activated T-cells (NFAT) und nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (NF- κ B) inhibiert FoxP3 die nachfolgenden Zytokin Transkription und reguliert dadurch die suppressive Kapazität der $\alpha\beta$ Treg-Zellen und im Allgemeinen die Immunantwort.¹⁰⁴ Weiterhin führt FoxP3 zur höheren Expression von CD25, CTLA-4, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) und TGF- β .^{105,106} Das Zytokin TGF- β hat neben einer wichtigen Rolle in der Entzündungsreaktion auch vielfältige regulatorische Funktionen im Immunsystem, wobei die anti-entzündliche, proliferationshemmende und immunsuppressive Wirkweise die überwiegende und bekannteste ist.¹⁰⁷ Im Menschen sind drei Isoformen bekannt von denen im Immunsystem des Menschen TGF- β 1 die dominante Rolle einnimmt. TGF- β phosphoryliert über die Bindung an Rezeptor-Serin/Threoninkinasen unter anderem Smad3, welches neben NFAT zur Induktion der FoxP3 Expression benötigt wird.¹⁰⁸ Weiterhin kann TGF- β in Kombination mit einem TZR-Stimulus (hier mit Antikörper gegen CD3 und CD28) einen Transkriptionsverstärker (Enhancer) von FoxP3 kontrollieren.¹⁰⁸ Es liegt daher nahe, dass TGF- β in naiven T-Zellen FoxP3 induziert.¹⁰⁹ Jedoch wurde auch gezeigt, dass lediglich eine TZR-vermittelte Stimulation (ebenfalls über anti-CD3/28) in CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen zur FoxP3 Expression führt und diese mit einer suppressiven Funktion gegenüber autologen CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen korreliert.¹¹⁰ In V γ 9V δ 2 T-Zellen konnte mit TGF- β in Kombination mit IL-15 und einem TZR-Stimulus über IPP FoxP3⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen angereichert und mit ihrer suppressiven Aktivität gegenüber autologen PBMCs korreliert werden.⁸⁴

IL-12 als ein Zytokin, das hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen auch lokal gebildet werden kann, aktiviert über den Transkriptionsfaktor STAT4 eine T_H1 Immunantwort.^{43,44} Auf die FoxP3 Expression hat IL-12 bei $\alpha\beta$ Treg-Zellen einen negativen Effekt, wie auch auf deren absolute Anzahl bei der Kultivierung dieser, welche von der T-Zell-Erschöpfung unabhängig war.¹¹¹

1.3 Apoptose

Es gibt zwei Arten von Zelltod: Apoptose und Nekrose. Während die Apoptose das Immunsystem nicht aktiviert, also die Toleranz des Immunsystems aufrechterhält, führen nekrotische Prozesse zur Aktivierung des Immunsystems.

Tagtäglich gehen Milliarden Körperzellen durch Apoptose zu Grunde. Zytotoxischen T-Zellen führen gezielt virusinfizierte oder entartete Zellen in die Apoptose. Im Gegensatz zur Nekrose betrifft die Apoptose meist einzelne Zellen und es kommt zu keiner Freisetzung von Zytoplasma mit einer folgenden Entzündungsreaktion. Stattdessen findet die Apoptose kontrolliert und durch die untergehende Zelle selbst aktiv durchgeführt statt. Es werden drei Mechanismen unterschieden, die die Apoptose initiieren können: (1) extrinsisch, (2) intrinsisch und (3) durch den von Mitochondrien freigesetzten Apoptosis-Inducing Factor (AIF).

Beim extrinsischen Mechanismus binden die unter anderem von aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen sezernierten Liganden TNF- α , TRAIL und Fas-L auf der Zelloberfläche der Zielzelle an „Todesrezeptoren“, die der TNF Rezeptor Superfamilie angehören. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 (Caspasen sind Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen). Die Initiatorcaspase 8 aktiviert wiederum die Effektorcaspase 3, welche eine zentrale Rolle in der Ausführungsphase der Apoptose einnimmt. Die Caspase 3 spaltet neben DNA-reparierenden Enzymen auch viele andere Substrate des Zytoplasmas, des Zellkerns sowie des Zytoskeletts und leitet damit die Apoptose ein.¹¹² Beim intrinsischen Weg wird durch intrazelluläre Stimuli wie DNA Schäden das Protein 53 (p53) aktiviert. Aktiviertes p53 hat einen Anstieg der zur Bcl-2-Familie gehörenden proapoptotischen Proteine Bax und Bad zur Folge, welche die Permeabilität der Mitochondrienmembran erhöhen. Es kommt zum Ausstrom von Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma und dort zur indirekten Aktivierung von Caspase 9, welche wiederum die Effektorcaspase 3 aktiviert. Verbunden sind beide Wege über die Caspase 8, da diese ebenfalls die Permeabilität der Mitochondrienmembran erhöhen kann.¹³

Zu der Bcl-2-Familie gehören weiterhin das namensgebende antiapoptotische Protein Bcl-2 sowie Bcl-xL. Bcl-2 und Bcl-xL sind wie die Proteine Bax und Bad auf der Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindern durch einen negativen regulatorischen Einfluss auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran den

Ausstrom von Cytochrom c in das Zytoplasma.¹¹³ $\gamma\delta$ T-Zellen nutzen die Expression von TRAIL, FasL, Perforin und Granzyme B für die Induktion von einem Toleranz erhaltendem Zelltod.⁵⁴

1.4 Gimap4

Gimap (GTPase of the immunity associated protein family, GIMAP) ist eine GTPase, die der Ras Superfamilie angehört. Gene dieser Ras GTPase wurden erstmals 1996 entdeckt.¹¹⁴ Bis jetzt wurden 8 in ihrer Primärstruktur sich unterscheidende Gimap Proteine beschrieben.¹¹⁵ Sie alle werden im Menschen hauptsächlich in Zellen des Immunsystems exprimiert und daher mit lymphoiden Funktionen in Verbindung gebracht.¹¹⁶ Tatsächlich werden Gimap Gene mit Autoimmunerkrankungen wie Morbus Behcet und im speziellen Gimap5 mit Lupus erythematodes assoziiert.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Während z.B. Gimap1 prinzipiell für das T-Zell Überleben wichtig ist und Gimap5 für die T-Zell-Homöostase, zeigten T-Zellen von Gimap4 Knockout Mäusen eine deutlich verlangsamte Apoptoserate nach 3-tägiger Inkubation mit Apoptose-Stimuli.^{120,121} Schnell et al. lieferten eine mögliche Erklärung: „*Gimap4 acts downstream of caspase 3 activation and Phosphatidylserin exposure*“.¹²⁰ Aus dieser Beobachtung schlussfolgerten Schnell et al. eine beschleunigende Wirkung von Gimap4 auf die Ausführungsphase der Apoptose in T-Zellen.¹²⁰ Weiterhin konnte ein höherer Phosphorylierungsgrad von Gimap4 als Substrat der Proteinkinase C in apoptotischen T-Zellen gefunden werden. Die Notwendigkeit der Phosphorylierung für eine apoptotische Funktion von Gimap4 liegt daher nahe.¹²⁰ Dagegen konnten Nitta et al. neben einer proapoptotische Funktion von Gimap4 in Thymozyten (Vorläufer Zelle der T-Zellen), auch eine spezifische Bindung von Bcl-2 und Bcl-xL an Gimap4 zeigen.¹²² Dem widerspricht, dass Bcl-2 und Bcl-xL zwar protektiv gegen Fas-vermittelte Apoptose wirken, Lee et al. jedoch einen protektiven Effekt gegen Fas-vermittelte Apoptose durch den Knockout von Gimap4 in T-Zellen zeigen konnten.¹¹⁷ Es werden daher neben den apoptotischen Funktionen auch antiapoptotische Funktionen für Gimap4 diskutiert.

Gimap4 befindet sich in T-Lymphozyten hauptsächlich im Zytosol, im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat.¹²³ Aufgrund der Assoziation mit dem Zytoskelett vermuteten Heinonen et al. daher eine weitere Funktion von Gimap4

im zellulären Transport. Während der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen ist Gimap4 weiterhin wichtig für die IFN- γ Sekretion.¹¹⁹ Daneben zeigte sich eine IL-12 vermittelte Hochregulation der Gimap4 Expression während der T_H1 Differenzierung.¹²³

Nichtsdestotrotz ist über die Funktion von Gimap4 in T-Zellen erst sehr wenig bekannt. Insbesondere mögliche Effekte von Gimap4 speziell in der immunregulatorischen Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen sind bis heute nicht Gegenstand der Forschung und bleiben weiterhin unklar.

1.5 Zielsetzung

Nach neueren kritischen Erkenntnissen gegenüber der etablierten Rolle von FoxP3 bei immunregulatorischen Prozessen, sollte in dieser Arbeit FoxP3 als Marker für induzierte $\gamma\delta$ Treg-Zellen weiter untersucht werden. Wir hypothetisierten eine von FoxP3 unabhängige Gimap4 vermittelte immunregulatorische Funktion, da Untersuchungen unseres Labors zeigen konnten, dass die immunsuppressive Funktion von $\gamma\delta$ Treg-Zellen FoxP3 unabhängig erfolgt.

Die molekularen Grundlagen für eine regulatorische Wirkung von V γ 9V δ 2 T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen sind in ihrer Komplexität nicht verstanden. Das Verständnis des Verhaltens der V γ 9V δ 2 T-Zellen gegenüber dem eigenen Immunsystem ist aber insbesondere bei den zunehmenden klinischen Anwendungen zellbasierter Therapien wichtig.

Die Zielsetzung der Arbeit war daher folgende:

1. Induktion immunsuppressiver V γ 9V δ 2 T-Zellen
2. Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Expression des Transkriptionsfaktor FoxP3 und der immunsuppressiven Funktion von IL-15/IPP/TGF- β stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen
3. Induktion von Gimap4 in V γ 9V δ 2 T-Zellen. Untersuchung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen der Gimap4 Expression und einer Apoptose-induzierenden/immunsuppressiven Funktion stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen gegenüber aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen
4. Untersuchung der Expression der zytolytischen Proteine Perforin/Granzyme B sowie Gimap4 als mögliche Wirkmechanismen für das beobachtete immunsuppressive Potenzial von aktivierten V γ 9V δ 2 T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Ausgehend von Casetti et al. sollten die immunregulatorischen Funktionen bzgl. des apoptotischen und suppressiven Potenzials von humanen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen untersucht werden.

PBMCs (peripheral blood mononuclear cell; PBMCs) wurden aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Probanden isoliert und anschließend die darin enthaltenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen spezifisch mit IPP einmalig über ihren TZR aktiviert. Die darauffolgende Kultivierung über 10 Tage fand in Anwesenheit von IL-2, IL-15 sowie den Zytokinen IL-12 und/oder TGF- β bzw. ohne Anwesenheit weiterer Zytokine statt. Nach 10 Tagen wurde der Anteil an $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen an $CD3^+$ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen mit der MACS Technologie positiv isoliert. Die Isolation aller Zellen erfolgte unter einer Reinheitskontrolle mittels Durchflusszytometrie (Reinheit >90 %).

Die stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wurden mit aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen kokultiviert und nach 20h die Apoptose- bzw. nach 72h die Wachstumsraten der aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen mit Hilfe eines Annexin V/7AAD bzw. CFSE Assays ermittelt. Als Kontrollen dienten Apoptose- bzw. CFSE Assays mit positiv isolierten nativen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen und aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen sowie reine aktivierte $\alpha\beta$ T-Zellkulturen.

Mehrere der immunregulatorischen Funktionen der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen zugrunde liegenden möglichen Wirkmechanismen wurden mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Die Expressionsniveaus von folgenden Proteinen wurden dabei ermittelt: Gimap4, FoxP3, T-bet, Eomes, IFN- γ , Perforin und Granzyme B. Die Gimap4 Expression wurde zusätzlich intrazellulär mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

2.2 Ethikvotum

Über das Vorhaben wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen positiv beschieden und unter der Nr. 105/2017B02 geführt.

2.3 Isolierung von mononukleären Zellen des Peripherblutes

Von 7 freiwilligen gesunden Spendern (Alter 20-25 Jahre) wurden aus heparinisiertem Vollblut (entnommen aus peripherer Venenpunktion) PBMCs mittels der Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Das durch die Venenpunktion gewonnene Vollblut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma, Katalognr.: D8537-500ml) verdünnt und anschließend in einem 50 ml Falconröhrchen (50ml polypropylene Tubes, Greiner Bio-on, Katalognr.: 227261) auf 15 ml Biocoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom GmbH, Katalognr.: L 6113) geschichtet. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 800g und ausgeschalteter Bremsfunktion (Rotanta 46 RSC, Hettich Katalognr.: L 6113) wurde der dem Biocoll aufliegende „Lymphozytenring“, der die PBMCs enthält, mithilfe einer Pipetthierhilfe (accu-jet® pro, Brand, Katalognr.: 26300) und einer 10 ml Stabpipette (Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, Sigma, Katalognr.: CLS4492) abgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen transferiert. Die abpipettierten PBMCs wurden auf ein totales Volumen von 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 450g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Konus mit Pasteurpipetten aspiriert (X1000 Pasteurpipet 230 mm WU Mainz, Wilhelm Ulbrich, Katalognr.: 10012064), das Zellpellet mit der restlichen Lösung resuspendiert, mit PBS auf 14 ml aufgefüllt und bei 450g für 12 min zentrifugiert. Nach wiederholtem Aspirieren wurde das Zellpellet in „Lysepuffer“ (hypotone Lösung: 1,8 ml sterilem Wasser mit 0,2 ml Lyse Buffer (Lysing Buffer, BD Pharm Lyse, Katalognr.:555899) resuspendiert und für 2 min im Dunkeln inkubiert. Die Lysereaktion wurde durch das Auffüllen mit PBS bis zu einem Volumen von 10ml abgestoppt. Die Lösung wurde bei 250g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml RPMI 1640 (s.u.) zur Vorbereitung der nachfolgenden Isolation der V γ 9V δ 2 T-Zellpopulationen bzw. zum Ansetzen der Effektorulturen resuspendiert.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl pro ml wurde mit einer Zählkammer (Zählkammer nach Neubauer doppelt, Assistent, Katalognr.: HCT 40441702), Trypanblau (Trypan Blue Solution, Sigma, Katalognr.: T8154-100ml) und einem Mikroskop (Olympus IX50, Olympus,

Katalognr.: IX-ILL30) manuell bestimmt. Dafür wurden 2 µl Zellsuspension evtl. mit 18 µl PBS verdünnt und 2 µl der (verdünnten) Zellsuspension mit 18 µl Trypanblau versetzt (Verdünnungsfaktor 10). Es wurden davon ca. 10 µl unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert und anschließend in allen vier Quadranten die lebenden Zellen ausgezählt. Lebenden Zellen werden im Gegensatz zu Zellen mit Membranschäden nicht von Trypanblau angefärbt. Die endgültige Zellkonzentration kann mithilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl} = \left(\frac{\text{Zellzahl } 4 \text{ Quadranten}}{4} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.5 Kultivierung und Anreicherung von Vγ9Vδ2 T-Zellen

2.5.1 Kulturmedium

Die Zelllösungen wurden in 24-well-plate (flat bottom) (24 Cell Cultur Cluster, Corning Costar, Katalognr.: CLS3524) bei 37,0 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator (Thermo Heracell 150 CO-Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.:2510-410-37) kultiviert.

Die Zellkonzentration bei der Kultivierung lag bei 4x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium. Das Kulturmedium wurde zusammengestellt aus 440 ml RPMI 1640 (RPMI 1640, Biochrom, Katalognr.: F1215), 50 ml fetales Kälberserum (FBS, Biochrom, Katalognr.: S0415) und 10 ml Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml, Biochrom, Katalognr.: A 2213). Die Kultivierungsdauer betrug 10 Tage.

2.5.2 Expansion von Vγ9Vδ2 T-Zellen

Die isolierten PBMCs jedes Spenders wurden in vier Gruppen à 4 Millionen PBMCs aufgeteilt und in je 1 ml Kulturmedium resuspendiert (Zellkonzentration: 4x10⁶ Zellen/ml). Die vier Gruppen bestanden aus IL-12 (7,5 ng/ml) (rh IL-12, Immuno Tools, Katalognr.: 11349125), TGF-β (1,7 ng/ml) (rh TGF-beta 1, Immuno Tools, Katalognr.: 11343160) und IL-12 (7,5 ng/ml) mit TGF-β (1,7 ng/ml) stimulierten PBMCs sowie einer Kontrollgruppe ohne Anwesenheit von IL-12 oder TGF-β. Alle Kulturen erhielten darüber hinaus IL-2 (6.5 U/ml) (Proleukin, Novartis, nur für Klinikbedarf) und IL-15 (10 ng/ml) (rh IL-15, Immuno Tools, Katalognr.: 11340152).

Am Tag 0 der Stimulation wurde zusätzlich jeder Gruppe IPP (20 µg/ml) (Isopentenyl pyrophosphate triammonium salt solution, Sigma Alderich, Katalognr.: I0503-1VL) hinzugefügt. An den Tagen 3, 6, 9 wurde die Hälfte des Kulturmediums gewechselt. Dabei wurden die Überstände bei 300g für 7 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das evtl. vorhandene Zellpellet in je 0,5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und mit IL-2, IL-15 und je nach Gruppe zusätzlich mit IL-12 (erst ab Tag 6) und/oder TGF-β supplementiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37,0 °C und 5 % CO₂ in 24-well-plates (flat bottom) inkubiert.

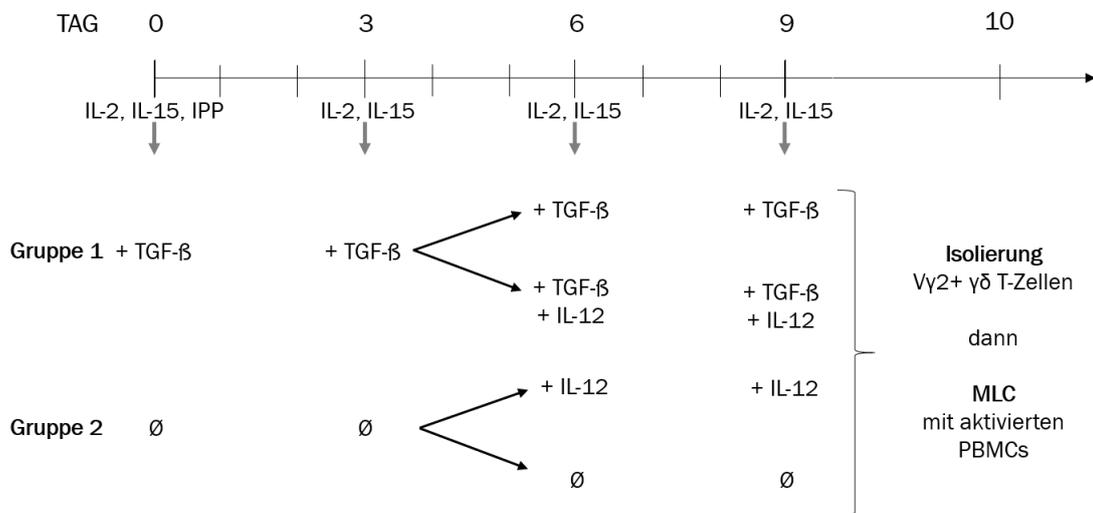


Abb. 2: Stimulationsschema von PBMC Kulturen mit Zytokinen zur Anreicherung von potenziell immunsuppressiven Vγ9Vδ2 T-Zellen

2.6 Isolierung Vγ9Vδ2 T-Zellen mittels MACS Technologie

Zur Isolierung von Vγ9Vδ2 T-Zellen aus PBMCs wurden die Vγ9Vδ2 T-Zellen mit einem Primärantikörper markiert, der den TZR Vγ9Vδ2 erkennt. Nachfolgend wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der an magnetische Beads (Anti-PE MicroBeads, Miltenyi Biotec, Katalognr.:130-048-801) gekoppelt ist und anschließend wurden die Vγ9Vδ2 T-Zellen mit Hilfe einer MS Säule (MS Columns, Miltenyi Biotec, Katalognr.:130-042-201), die einem starken Magnetfeld ausgesetzt war, isoliert.

Da MS Säulen für bis zu 10⁷ gelabelte Zellen geeignet sind, musste vor der Isolation die Zellzahl der PBMC Zellsuspension bestimmt werden. Die isolierten PBMCs wurde bei 300g für 10 min bei 8 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in 200 µl MACS Buffer (autoMACS Rinsing Solution, Miltenyi Biotec, Katalognr.:130-091-222) und 5 µl primärem Vγ9Vδ2 Antikörper (PE Mouse

Anti-human V γ 9V δ 2 TCR, BD Pharmingen, Katalognr.: 555739) resuspendiert. Nach 30 min bei 8 °C im Kühlschrank (FKUv 1610 Premium, Liebherr, Katalognr.: 9005382167090) wurden die gelabelten Zellen mit 1 – 2 ml MACS Buffer pro 10⁷ Zellen, bei 8 °C und 300g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 80 μ l MACS Buffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert und mit 20 μ l Anti-PE MicroBeads (Anti-PE MicroBeads, Miltenyi Biotec, Katalognr.:130-048-801) pro 10⁷ Zellen für 15 min bei 2-8 °C im Kühlschrank magnetisch gelabelt. Es erfolgte ein Waschschriff mit 1-2 ml Buffer pro 10⁷ Zellen bei 300g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 μ l MACS Buffer resuspendiert.

Die MS Column wurde in einem MiniMACS Magneten (MiniMACS Separator, Miltenyi Biotec, Katalognr.:130-042-102), welche in einem MultiStand (MultiStand, Miltenyi Biotec, Katalognr.:130-042-303) befestigt war, platziert. Die MS Column wurde mit 500 μ l MACS Buffer gewaschen und dann mit 500 μ l Puffer-Zellgemisch beladen. Nachdem das Zellgemisch die Säule durchlaufen hat, wurde die MS Column dreimal mit jeweils 500 μ l MACS Buffer gewaschen. Die Säule wurde aus dem Magneten entnommen und auf ein 15ml Zentrifugationsröhrchen (15ml polypropylene Tubes, Greiner Bio-on, Katalognr.: 188261) platziert. Die Säule wurde mit 1 ml MACS Buffer beladen und die Positivfraktion mithilfe des beiliegenden Stopfens aus der Matrix mit starkem Druck herausgespült. Positiv- wie Negativfraktion wurden für 10 min mit 300g bei 8 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Darauf folgte eine Zellzahlzählung, sowie die Überprüfung der Reinheit der Positiv- und Negativfraktion mittels Fluorescence activated cell sorting (FACS) bzgl. dem Anteil an V γ 9V δ 2 T-Zellen an CD3⁺ T-Zellen.

2.7 Mixed Lymphocyte Culture (MLC)

2.7.1 Kulturbedingungen

Die Mixed Lymphocyte Culture (Inkubation von zwei isolierten Lymphozytenpopulationen eines Spenders) wurden in round bottom 96 Well Cell Culture Plate (96 Well Cell Culture Plate, Greiner bio-one, Katalognr.: 650 180) im Inkubator bei 37,0 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Als Kulturmedium diente RPMI 1640 mit beigefügtem fetalem Kälberserum (10 %) sowie Penicillin/Streptomycin (2 %).

Die Ansätze für die Apoptose bzw. CFSE Assays wurden jeweils in mit Dynabeads (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: 11131D) aktivierte und unaktivierte Experimentalgruppen aufgeteilt. Die jeweiligen Gruppen bestanden aus 100 µl (100 000 Zellen/100 µl RPMI) frischen oder über 10 Tage stimulierten und dann isolierten Vγ9Vδ2 T-Zellen in Koinkubation mit 100 µl (100 000 Zellen/100 µl RPMI) durch CD3/28 aktivierende Dynabeads aktivierte bzw. nicht aktivierte PBMCs des gleichen Spenders. Die mit Dynabeads aktivierten bzw. nicht aktivierten Kontrollgruppen bestanden aus 200 µl (100 000 Zellen/100 µl RPMI) PBMCs zu sonst gleichen Bedingungen. Für die Apoptose und CFSE Assays der frischen nicht stimulierten Vγ9Vδ2 T-Zellen wurden am gleichen Tag isolierte PBMCs verwendet. Bei den Apoptose- und CFSE Assays der stimulierten Vγ9Vδ2 T-Zellen wurden am Tag davor vom gleichen Spender PBMCs isoliert, über Nacht bei 4×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 im 48 well plate (48 Cell Culture Cluster, Corning Costar, Katalognr.: CLS3524) mit 50 U/ml IL-2 bei 37,0 °C und 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Tag für die MLC verwendet.

Allen Ansätzen wurden beim Ansetzen der MLC 10 Units (U) IL-2 hinzugegeben (50U/ml).

2.7.2 CFSE labeling

Die PBMCs wurden zur Bestimmung ihrer Proliferation mittels CFSE (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: C34557) markiert. Das CFSE diffundiert dabei passiv in die Zelle und bindet an zelleigene Amine. Bei der Proliferation der Zelle erfolgt eine Halbierung des gebundenen CFSE pro Zelle. Dieser Effekt stellt sich im FACS als Halbierung der Fluoreszenz dar. Die CFSE Färbung wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

Da die Mengenangaben des Protokolls auf 1×10^6 Zellen optimiert sind, wurden die PBMCs gezählt und wenn nötig die verwendeten Mengen entsprechend extrapoliert. Die PBMCs wurden in 5 ml PBS mit 450 g für 7 min gewaschen, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. 1 µl 5mM CFSE wurden hinzugefügt, leicht gevortext und die Zellsuspension für 20 min bei 37,0 °C und 5 % CO₂ im Dunkeln inkubiert. Das nicht diffundierte CFSE wurde mit 10 ml 37 °C warmen RPMI mit 450 g für 7 min ausgewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Entsprechend der

Zellzahl wurde die Zellkonzentration durch Hinzugabe von RPMI auf 1×10^6 Zellen pro ml angepasst und anschließend in 48 Well Cell Culture Plate in zwei Gruppen überführt. Eine Gruppe wurde im Gegensatz zu der anderen anschließend durch Hinzugabe von Dynabeads aktiviert.

2.7.3 Aktivierung durch DYNABeads

Die Dynabeads (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: 11131D) wurden vor der Verwendung wie vom Hersteller angegeben gewaschen. Für 2×10^6 PBMCs wurden 13,5 μ l Dynabeads (4×10^7 beads/ml) in 1 ml Dynabeads Wash Buffer im 1,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes 1.5 ml, Eppendorf, Katalognr.: 0030 120.086) pipettiert, 5 Sekunden gevortext (Reax top, Heidolph, Katalognr.: 541-10000-00) und für 1 Minute in eine DynalMPC-E (DynalMPC-E, Dynal, Katalognr.: 120.04) gestellt. Der Überstand wurde abpipettiert und die Dynabeads nach dem Herausnehmen aus der DynalMPC-E in 20 μ l RPMI resuspendiert. Die aktivierten PBMC Gruppen wurden für die Apoptose bzw. CFSE Assays durch Hinzugabe von jeweils 10 μ l Dynabeads in einer 48 Well Cell Culture Plate aktiviert, gut gemischt und à 100 μ l (100 000 Zellen/100 μ l RPMI) für die aktivierten Experimentalgruppen bzw. 200 μ l (100 000 Zellen/100 μ l RPMI) für die aktivierten Kontrollgruppen in 96 Well Cell Culture Plates überführt. Die frischen bzw. die über 10 Tage stimulierten und dann isolierten V γ 9V δ 2 T-Zellen wurden à 100 μ l (100 000 Zellen/100 μ l RPMI) in die Zielzellensuspension gegeben.

2.8 Durchflusszytometrie basierte Assays

2.8.1 Durchflusszytometrie

2.8.1.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zellpopulationen mittels der Durchflusszytometrie wurde das FACSCanto II System (FACSCanto II System with Fluidics Cart, BD Bioscience, Katalognr.:338962) verwendet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist, dass die zu untersuchenden Zellen mit Antikörper markiert werden deren Fluorochrome im FACS durch Laser angeregt werden. Die Detektoren des FACSCanto II messen dann die Lichtintensitäten, die ein Fluorochrom nach seiner Anregung im entsprechenden Laser bei einer definierten

Wellenlänge emittiert. Die FACS Analyse ist damit eine der wenigen Methoden bei der Mischpopulationen auf Einzelzellebene analysiert werden können. Anhand der Intensität des emittierten Lichtes lassen sich außerdem quantitative Rückschlüsse z.B. über Zellzahlanteile in Mischpopulationen sowie über die Expressionsstärke von untersuchten Markermolekülen ziehen.

In dieser Arbeit wurden sowohl Oberflächenproteine wie CD3, der $\gamma\delta$ TZR und der $\alpha\beta$ TZR als auch intrazelluläre Proteine wie Gimap4 markiert. Es wurden Antikörper mit folgenden Farbstoffmarkierungen verwendet: FITC, V450, V500, PE, APC, APC Cy7, PerCP.

2.8.1.2 Bestimmung der Frequenz von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in frisch isolierten PBMCs

Der Anteil an $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen an $CD3^+$ Zellen wurde aus frischen bzw. über 10 Tage stimulierten PBMCs bestimmt. Dieser Schritt erfolgte vor der Isolation der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Es wurden ca. 50 μ l der im Kulturmedium resuspendierten, isolierten PBMCs in ein FACS Röhrchen (5 ml round bottom tubes, polystyrene, Greiner, Katalognr.: 115101) transferiert und folgende Antikörper hinzugefügt: 1 μ l CD3 FITC (CD3 (SK7), BD Bioscience, Katalognr.: 345763), 1 μ l 7AAD (7AAD, BD Pharmingen, Katalognr.: 559925), 0,5 μ l $V\gamma 9V\delta 2$ TCR PE.

Das Zellgemisch wurde für 15 min im Dunkeln inkubiert und mit 2 ml FACS Buffer (PBS + 2 % FCS) bei 660g für 2min gewaschen. Der Überstand wurde abgekippt und die Probe in 100 μ l FACS Buffer resuspendiert. Nach sanftem Vortexen wurden die Proben im FACSCanto II analysiert.

2.8.1.3 Reinheitskontrolle

Zur Kontrolle der Isolation von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen aus frischen bzw. über 10 Tage stimulierten PBMCs wurde der Anteil von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zelle an der isolierten lebenden $CD3^+$ Zellpopulation bestimmt. Dafür wurden 20 μ l der im Kulturmedium resuspendierten, isolierten Zellen in ein FACS Röhrchen transferiert und folgende Antikörper hinzugefügt: 1 μ l CD3 FITC, 1 μ l 7AAD.

Für die für die Isolation mit $V\gamma 9V\delta 2$ TCR PE gelabelten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen war eine weitere Markierung des $\gamma\delta$ TZR obsolet. Die Zellen wurden für 15 min im Dunkeln inkubiert und mit 2 ml FACS Buffer bei 660g für 2 min gewaschen. Der Überstand

wurde abgekippt und die Probe in 100 µl FACS Buffer resuspendiert. Nach sanftem Vortexen wurden die Proben mittels FACS gemessen. Lag die Reinheit der Zellpopulation bei >95 % wurden die Versuche fortgesetzt.

2.8.2 Apoptose Assay

Nach 20-stündiger Inkubation der Apoptoseassays wurden die MLCs sanft durchgemischt und 200 µl der mit Dynabeads über CD3/28 aktivierten Ansätze in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurden wie vom Hersteller der Dynabeads empfohlen vor der Verwendung der Durchflusszytometrie die Dynabeads herausgewaschen. Dafür wurde das Zellgemisch in 1 ml PBS suspendiert und das Reaktionsgefäß für 1 Minute in einen DynalMPC-E Magneten platziert. Der Überstand wurde nach dem Herausnehmen aus dem DynalMPC-E Magneten in FACS Röhrchen transferiert. Die nicht aktivierten Gruppen wurden direkt in FACS Röhrchen überführt und 1 ml PBS hinzugefügt. Nach dem Abzentrifugieren bei 660g für 2 min wurden für die Apoptose Assays zum Markieren der Oberflächenmoleküle folgende Antikörper pro Probe verwendet: 1 µl Anti-TCR $\gamma\delta$ 1 FITC (Anti-TCR $\gamma\delta$ 1 (11F2), BD Bioscience, Katalognr.: 347903), 1 µl CD3 FITC, 1 µl Anti-TCR $\alpha\beta$ -APC (Anti-TCR $\alpha\beta$ -APC, Miltenyi Biotec, Katalognr.: 130-098-859) (bei einem Probanden wurde anstatt Anti-TCR $\alpha\beta$ -APC der ungelabelte Primärantikörper VH31 verwendet, der anschließend mit Anti-human IgG Fc - APC (APC Anti-human IgG Fc, BioLegend, Katalognr.: 409306), einem Fluorochrom, gelabelt wurde.)

Zum Färben aller Proben wurde ein Mastermix der Antikörper angesetzt und je 4 µl Mastermix pro Probe pipettiert. Nach kurzem Vortexen erfolgte die Inkubation für 15 min im Dunkeln. Anschließend wurde ein Waschschrift mit 2 ml PBS bei 660g für 2 min durchgeführt. Im letzten Schritt wurden pro Probe 450 µl steriles Wasser (Water, Sigma, Katalognr.: W3500-500ML) mit 50 µl Annexin Buffer (10X Annexin V Binding Buffer, BD Pharmingen, Katalognr.: 51-66121E) angesetzt und nach dem Waschschrift 100 µl des 10-fach verdünnter Annexin Buffer pro Probe hinzugefügt. Jede Probe wurde mit je 1 µl Annexin V - PE (PE Annexin V, BD Pharmingen, Katalognr.: 556421) und 1 µl 7AAD als Mastermix angefärbt. Nach einer Inkubation im Dunkeln von 15 min wurden 400 µl 10-fach verdünnter Annexin Buffer hinzugefügt und sofort mittels dem FACSCanto II analysiert.

Annexin V und 7AAD ermöglichen das Anfärben von lebenden, früh-apoptotischen und apoptotischen Zellen einer Zellkultur. Annexin V bindet dabei an Phosphatidylserin, welches in gesunden Zellen nur auf der inneren Seite der Zellmembran vorhanden ist (asymmetrisch). Geht die Zelle in die Apoptose über, kommt es zu einem Verlust der asymmetrischen Lokalisation von Phosphatidylserin und die Zelle erscheint im Assay Annexin V positiv. 7AAD bindet dagegen an die DNA der Zelle. Kann 7AAD an die DNA einer Zelle binden, hat diese die Integrität ihrer Zellmembran verloren. Bei Verlust der Zellintegrität ist die Zelle im apoptotischen oder nekrotischen Zustand. In der Kombination beider Antikörper lässt sich dadurch die Zellkultur in lebende (doppelt negativ), früh-apoptotische (Annexin V positiv, 7AAD negativ) apoptotische (doppelt positiv) und nekrotische Zellen (Annexin V negativ, 7AAD positiv) unterscheiden (s. Abb. 3).

2.8.3 CFSE Assay

Nach 3-tägiger Inkubation der Suppressionsassays wurden die MLCs mithilfe der Pipette sanft gemischt und 100 µl in FACS Röhrchen überführt. Zum Anfärben der Zellmarker wurden folgende Antikörper pro Probe verwendet: 1 µl CD3-FITC, 1 µl Anti-TCR αβ-APC, 1 µl 7AAD, 0,5 µl Vd2-PE (PE Mouse Anti-Human Vγ9Vδ2 TCR, BD Pharmingen, Katalognr.: 555739). Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln erfolgte mit 2 ml FACS Buffer bei 660g für 2 min ein Waschschrift, der Überstand wurde abgeschüttet und in 200 µl FACS Buffer resuspendiert. Nach sanftem Vortexen wurden die Proben mittels FACS gemessen.

2.8.4 Gimap4

Der intrazelluläre Gimap4 Gehalt von Vγ9Vδ2 T-Zellen wurde von frischen und 10-tägig stimulierten Vγ9Vδ2 T-Zellen mittels dem Fix&Perm Kit (Fix&Perm, Nordic MUBio, Katalognr.: GAS-002-1) bestimmt. Dabei wurden stets die gleichen Zellzahlen verwendet (100 000 Zellen pro Probe) sowie die gleichen Antikörper mit entsprechender Menge. Für die Bestimmung der Gimap4 Expression wurden isolierte Vγ9Vδ2 T-Zellen (Reinheit > 90 %) verwendet.

Zum Anfärben der Zelloberfläche wurden bei frischen Proben folgende Antikörper pro Probe verwendet: 1 µl Zombie Aqua (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, BioLegend, Katalognr.: 423102), 0,5 µl Vd2-PE 1 µl CD3-APC-Cy7 (APC-Cy 7 Mouse Anti-human,

BD Pharmingen, Katalognr.: 557832). Nach 15-minütiger Inkubation und anschließendem Waschschrift mit 2 ml PBS bei 660g für 2 min wurden die Zellen wie vom Hersteller empfohlen, intrazellulär gefärbt. Durch die 15-minütige Inkubation im Dunkeln mit 100 µl Reagenz A wurden die Zellen permeabilisiert und anschließend mit 4,5 ml PBS bei 300g für 5 min gewaschen. Mit 200 µl Reagenz B wurden die Zellen fixiert und die Proben in je eine Kontrollgruppe, die nur mit sekundärem Antikörper und eine Messgruppe, die zusätzlich mit 0,5 µl Gimap4 Antikörper (Gimap4 Antibody, Invitrogen, Katalognr.: PA5-50041) für 15 min inkubiert wurde, zu gleichen Zellzahlen aufgeteilt. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift beider Gruppen mit je 100 µl Reagenz B bei 300g für 5 min. Je beide Proben wurden mit 1 µl zehnfach verdünnten (1 µl Antikörper: 9 µl PBS) sekundär Antikörper fluorescein goat anti rabbit IgG (fluorescein goat anti rabbit IgG, Lifetechnologies Corporation, Katalognr.: F2765) für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 4,5 ml PBS bei 300g für 5 min wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und mit dem FACSCanto II der intrazelluläre Gimap4 Gehalt der Kontroll- und Messgruppe bestimmt. Bei der Auswertung wurde der Threshold zur Definition von Gimap4⁺ als 0,5 % der Kontrollgruppe festgelegt.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 RNA Gewinnung

Zur Isolation der RNA von Vγ9Vδ2 T-Zellen wurde abhängig der Zellzahl das RNeasy Mini Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Katalognr.:74104) oder das RNeasy Micro Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Katalognr.:74104) verwendet: bei bis zu 500 000 Zellen wurde das RNeasy Mini Kit, bei weniger als 100 000 Zellen das RNeasy Micro Kit verwendet. Dabei wurde wie vom Hersteller angegeben vorgegangen.

2.9.1.1 RNeasy Mini Kit

Nach der Pelletbildung im 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 450g für 7 min (Zentrifuge 5424R, Eppendorf, Katalognr.: 5404 000.014) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 350 µl bestehend aus 315 µl RLT Buffer (enthalten im RNeasy Mini Kit) und 35 µl 2-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, Sigma, Katalognr.: M3148-100ml) resuspendiert. Nach diesem Schritt kann die Probe bei -80 °C (Forma

Scientific -86C Freezer, Thermo Fisher Scientific, Verkauf eingestellt) aufbewahrt werden.

Zur Homogenisierung wurde das Lysat auf eine QIAshredder-Säule (QIAshredder, Qiagen, Katalognr.:79656) transferiert und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco, Heraeus, Katalognr.:75005521). Zum Durchfluss wurde 350 µl 70 % Ethanol (70 % Ethanol (Ethanol, Sigma, Katalognr.: 1009831011) + 30 % Wasser (Water, Sigma, Katalognr.: W4502-1L)) hinzugefügt und gut gemischt. 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy Mini spin column transferiert und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Die RNeasy Mini spin column wurde mit 700 µl Buffer RW1 bei 15 Sekunden bei 10000 rpm gewaschen. Anschließend wurde die Spin column mit 500 µl Buffer RPE beladen und wiederum für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, jedoch wurde diesmal für 2 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Um die Membran der spin column zu trocknen, wurde die Spin Column in ein neues Sammelgefäß (2 ml) gesetzt und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Eluate wurden verworfen. Das Sammelgefäß wurde durch ein neues (1,5 ml) ausgetauscht und die Spin Column mit 30 µl RNase freiem Wasser nach einminütiger Inkubation für 1 min bei 10000 rpm eluiert.

2.9.1.2 RNeasy Micro Kit

Nach der Pelletbildung im 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 450g für 7 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 75 µl bestehend aus 67,5 µl RLT Buffer (enthalten im RNeasy Mini Kit) und 7,5 µl 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Nach diesem Schritt kann die Probe bei -80 °C für bis zu 2 Monate aufbewahrt werden.

Zur Homogenisierung wurde das Lysat auf eine QIAshredder-Säule transferiert und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Durchfluss wurden 75 µl 70 % Ethanol (70 % Ethanol + 30 % Wasser) hinzugefügt und gut gemischt. 150 µl der Probe wurden auf eine RNeasy Min Elute spin column transferiert und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Die RNeasy Min Elute spin column wurde mit 350 µl Buffer RW1 bei 15 Sekunden bei 10000 rpm gewaschen. Anschließend wurden 10 µl DNase I mit 70 µl Buffer RDD gemischt und die RNeasy Min Elute spin column mit 80 µl DNase I incubation mix für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNeasy Min Elute spin column wurde mit 500 µl Buffer RPE für 15 Sekunden bei 10000 rpm gewaschen und mit 80 % Ethanol beladen. Die Spin Column wurde für 2 min bei

10000 rpm abzentrifugiert, anschließend in ein neues Sammelgefäß (2ml) platziert und für 5 min bei 13000 rpm trocken zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde durch ein neues (1,5 ml) ersetzt und die Spin Column mit 14 µl RNase freiem Wasser nach einminütiger Inkubation für 1 min bei 13000 rpm eluiert.

2.9.1.3 RNA Konzentration und Aufbewahrung

Der RNA Gehalt der gewonnenen Proben wurde mit einem NanoDrop 2000 (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: ND-2000) bestimmt und bei Bedarf die RNA Konzentration mittels einer Vakuumzentrifuge (RVC 2-18, Christ, Katalognr.:4230119) auf >10ng/µl erhöht. Nach diesem Schritt kann die Probe wiederum bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.9.2 cDNA Synthese

Zur cDNA Synthese wurde der Super Script™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Super Script™ III First-Strand Synthesis SuperMix, Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: 18080400) verwendet. Dabei wurden aufgrund der geringen RNA Mengen die halben Mengenangaben zur Synthese einer cDNA wie vom Hersteller angegeben, verwendet.

Zur cDNA-Synthese wurden zu 3 µl RNA (evtl. aufgetaut) (Konzentration: >11ng/ µl) in PCR Tubes (Eppendorf PCR Tubes, Eppendorf PCR Tubes, Eppendorf, Katalognr.: 0030124359) 0,5 µl Annealing-Buffer und 0,5 µl Oligo(dT)-Primer (50 µM) pipettiert. Das Gemisch wurde bei 65 °C für 5 min im Thermocycler (GeneAmp™ PCR System 9700, Thermo Fisher Scientific, Verkauf eingestellt) denaturiert und anschließend sofort für mindestens 1 min auf Eis gestellt. Danach wurden 5 µl 2x First-Strand Reaction Mix und 0,5 µl SuperScript™ III/RNaseOUT™ hinzugefügt und die cDNA bei 50 °C für 50 min im Thermocycler synthetisiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min. Nach diesem Schritt wurden die Proben bei -20 °C gelagert oder direkt für die quantitative RT-PCR verwendet.

2.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

2.9.3.1 Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) dient der Amplifizierung von DNA. Dabei werden drei Reaktionsschritte fortlaufend wiederholt. Zuerst werden die

Doppelstränge der DNA Fragmente denaturiert (erster Schritt: Denaturierung), damit sich an die entstandenen DNA Einzelstränge Primer (spezifische Oligonukleotidsequenzen) anlagern (zweiter Schritt: Annealing) können. Die hinzugegebene Taq-Polymerase (in dieser Arbeit wurde die GoTaq Hot Start Polymerase verwendet), eine nach dem Bakterium *Thermus aquaticus* benannte thermostabile DNA-Polymerase, beginnt beim letzten Schritt (Elongation) der PCR die fehlenden Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) startend vom Primer aus aufzufüllen. Die optimale Temperatur für das Denaturieren der DNA beträgt 96 °C. Die optimalen Temperaturen für das Annealing sind primerspezifisch one-sample t-Test abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase. In diesem Fall betrug sie 72 °C.

Die quantitative Echtzeit-PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase Ketten Reaktion. Zusätzlich wird jedoch mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes der DNA Gehalt in Echtzeit ermittelt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde BRYT Green I verwendet, welcher sich an die entstehende DNA anlagert. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende der Elongation statt. Mittels der emittierten Fluoreszenzintensität lässt sich anhand des ct-Wertes (threshold cycle; Anzahl an benötigten Zyklen bis die Hintergrundfluoreszenz überschritten ist) der DNA Gehalt des zu untersuchenden Gens quantifizieren. Durch die Normalisierung mit einem Haushaltsgen (hier Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)), welches in jeder T-Zelle exprimiert wird, lassen sich Aussagen über die Genexpression vor und nach z.B. einer Stimulation ableiten, sowie Interassay-Vergleiche ziehen (besser bekannt als $2^{-\Delta CT}$ Methode). Bei Intraassay-Vergleichen wurde stattdessen die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode angewandt und die ermittelten Expressionsniveaus der IL-2/IL-15/IPP stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen als Referenzgruppe festgelegt.

2.9.3.2 Nachweis von FoxP3, Gimap4, Granzyme B, Perforin, IFN- γ

Die quantitativen Echtzeit-PCRs wurden im C1000™ Thermal Cycler (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Katalognr.:1841000) durchgeführt.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: Zuerst wurde die cDNA auf 2ng/l mit RNase freiem Wasser (aus RNeasy Mini Kit) verdünnt und in 0,2 ml 8-Tube PCR Strips (0,2 ml 8-Tube PCR Strips without Caps, BioRad, Katalognr.: TLS0851 + 0,2 ml Flat PCR Tubes 8-Cap Strips, BioRad, Katalognr.: TCS0803) überführt. Pro Probe wurden 5 μ l

GoTaq® qPCR Master Mix (GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-based Detection, Promega, Katalognr.: A6001), welche die GoTaq® Hot Start Polymerase, den fluoreszierenden DNA Farbstoff BRYT Green I sowie die nötigen Desoxynukleotid-triphosphate enthält, hinzugefügt. Zusätzlich wurden je 0,2 µl (Konzentration der Primer: 100 nM) sense und antisense des jeweiligen Primers hinzugefügt. Die Primer wurden von der Arbeitsgruppe designed und von der Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Folgende Primersequenzen wurden verwendet:

Tabelle 2: Eingesetzte PCR Primersequenzen

Primer	Sequenz
GAPDH (sense)	5`-CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT-3`
GAPDH (antisense)	5`-GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC AGA GT-3`
Granzyme B (sense)	5`-TTC GTG CTG ACA GCT GCT CAC T-3`
Granzyme B (antisense)	5`-CTC TCC AGC TGC AGT AGC ATG A-3`
Gimap4 (sense)	5`-AGG GCG GAG GAG GAG ATC CA-3`
Gimap4 (antisense)	5`-CCG TTC TTG GCC TTT GCT GCC T -3`
FoxP3 (sense)	5`-GAG AAG CTG AGT GCC ATG CA-3`
FoxP3 (antisense)	5`-GGA GCC CTT GTC GGA TGA T-3`
Perforin (sense)	5`-ACC AGC AAT GTG CAT GTG TCT G-3`
Perforin (antisense)	5`-GCC CTC TTG AAG TCA GGG T-3`
T-bet (sense)	5`-GCC TAC CAG AAT GCC GAG ATT A-3`
T-bet (antisense)	5`-ACT CAA AGT TCT CCC GGA ATC C-3`

2.10 Auswertung

2.10.1 Auswertung der Durchflusszytometrie

Zur Analyse, der im FACSCanto II gemessenen Daten, wurde die Software FlowJo (TriStars) verwendet. Das Gating des Apoptose Assays ist nach dem abgebildeten Schema folgend durchgeführt worden (s. Abb. 3).¹²⁴ Der Vorteil dieser Gating Strategie liegt in einer genaueren Unterscheidung zwischen „Apoptotic bodies“ und „Debris“.

Auch bei der Analyse für CFSE Assays wurde nach 7AAD⁻ CD3⁺ αβ T-Zellen dem obigen Schema folgend gegatet. Die qPCR wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft) ausgewertet.

2.10.2 Grafiken und Statistik

Für die Erstellung von Grafiken wurde MS PowerPoint und FlowJo sowie zusätzlich zum Testen auf Signifikanzen GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.) verwendet. Für parametrisch verteilte Stichproben (an einer Voraussetzung gekoppelte Stichproben, hier Voraussetzung normalverteilt) wurde der abhängige t-Test, für nicht parametrische verteilte Stichproben der Wilcoxon matched-pair signed rank Test angewendet. Weiterhin wurde für parametrische der one-sample t-Test für nicht parametrische der Wilcoxon signed-rank Test verwendet. Anhand des Shapiro-Wilk-Testes wurde die Normalverteilung der Stichproben geprüft, Ausreißer identifiziert und ggf. aus der Auswertung ausgeschlossen. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ definiert.

In den Abbildungen werden die Standardabweichungen angegeben und $p < 0,05$ mit „*“, $p < 0,01$ mit „**“, $p < 0,001$ mit „***“ bzw. $p < 0,0001$ mit „****“ dargestellt.

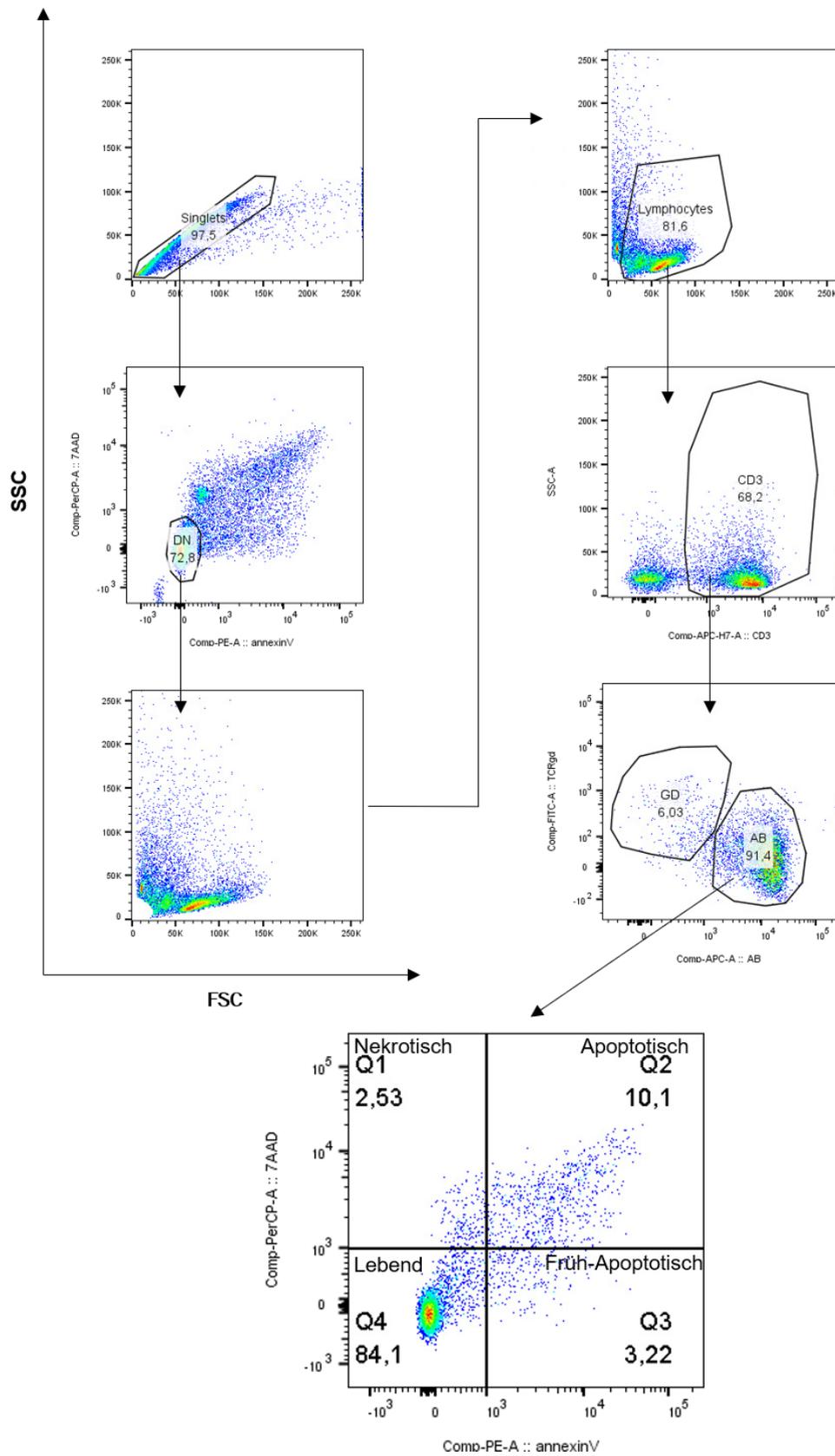


Abb. 3: Gating Strategie des Apoptoseassays mittels FlowJo am Beispiel des Peripherblutes eines repräsentativen, gesunden und freiwilligen Probanden (Q1:7AAD⁺, Annexin V⁻; Q2:7AAD⁺, Annexin V⁺; Q3:7AAD⁻, Annexin V⁺; Q4:7AAD⁻, Annexin V⁻)

3 Ergebnisse

3.1 Stimulation von V γ 9V δ 2 T-Zellen

Von 7 verschiedenen Probanden wurden die PBMCs aus Vollblut isoliert und einmalig mit IPP über ihren TZR stimuliert. Nachfolgend wurden die PBMCs in Anwesenheit von IL-2, IL-15 sowie mit den Zytokinen IL-12 und/oder TGF- β bzw. ohne Anwesenheit weiterer Zytokine für 10 Tage kultiviert. An den Tagen 0 und 10 wurden anhand der Durchflusszytometrie die Anteile der V γ 9V δ 2 T-Zellen an den CD3⁺ Zellen bestimmt. Bei frisch isolierten PBMCs betrug der V γ 9V δ 2 T-Zellanteil an CD3⁺ Zellen $4,12 \pm 1,94$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung) (s. Abb 5). Nach einmaliger Stimulation mit IPP und der nachfolgenden Kultivierung mit IL-2 und IL-15 (kurz: IL-15/IPP) stieg der V γ 9V δ 2 T-Zellanteil auf $56,94 \pm 7,55$ % nach 10 Tagen an. Der Stimulationsansatz IL-15/IPP zeigte den signifikant stärksten Anstieg des V γ 9V δ 2 T-Zellanteils aller Versuchsgruppen. War zusätzlich das antiinflammatorische Zytokin TGF- β bei der Kultivierung anwesend, betrug der V γ 9V δ 2 T-Zellanteil nach 10 Tagen $43,99 \pm 7,91$ %. Den geringsten V γ 9V δ 2 T-Zellanteil von $30,96 \pm 8,32$ % zeigten mit der Kombination IL-15/IPP/IL-12 stimulierte PBMC Kulturen. Spannenderweise konnte bei der Kombination IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 dagegen der wachstumshemmende Effekt vom IL-12 durch die Anwesenheit von TGF- β fast vollständig antagonisiert werden ($41,76 \pm 5,48$ %).

Bei allen Kombinationen zeigten die V γ 9V δ 2 T-Zellen ein dem IL-15/IPP folgendes Expansionsverhalten auf. Alle 7 Probanden waren in Bezug auf die Expansion Responder. In Abb. 4 ist das typische Expansionsverhalten von V γ 9V δ 2 T-Zellen eines repräsentativen Probanden dargestellt.

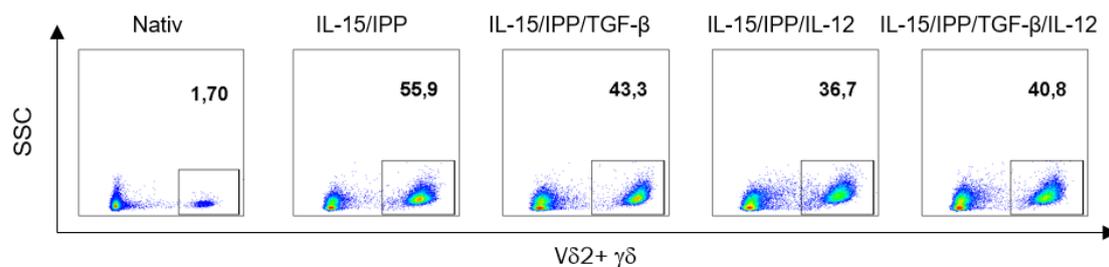


Abb. 4: Prozentualer Anteil V δ 2 T-Zellen an CD3⁺ Zellen in nativen und über 10 Tage stimulierten PBMC Kulturen am Beispiel eines repräsentativen Probanden in der FACS Analyse

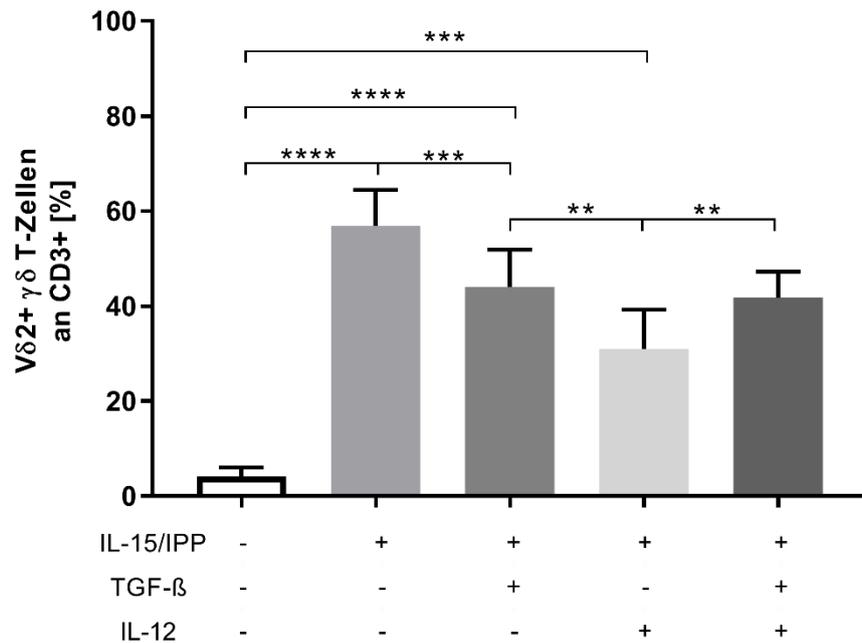


Abb. 5: Prozentualer Anteil Vδ2 T-Zellen an CD3⁺ Zellen in nativen (-) und über 10 Tage stimulierten (+) PBMC Kulturen; Signifikanztestung: abhängiger t-Test mit „**“ für $p < 0,01$, „***“ für $p < 0,001$ bzw. „****“ für $p < 0,0001$

3.2 Zytotoxisches Potenzial von Vγ9Vδ2 T-Zellen gegenüber aktivierten autologen αβ T-Zellen

3.2.1 Aktivierte Vγ9Vδ2 T-Zellen induzieren in aktivierten autologen αβ T-Zellen Apoptose

Erstveröffentlichung in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)

Nach der Expansion der Vγ9Vδ2 T-Zellen untersuchten wir deren Potenzial, Apoptose in CD3/28 aktivierten autologen αβ T-Zellen zu induzieren. Aus frischen bzw. mit IPP in verschiedenen Zytokinkombinationen stimulierten PBMCs wurden Vγ9Vδ2 T-Zellen mit der MACS Technologie positiv isoliert. Im Effektor-/ Zielzellen-Verhältnis 1:1 wurden isolierte Vγ9Vδ2 T-Zellen mit autologen PBMCs, deren Lymphozyten zu 30 % aus CD3⁺ T-Zellen bestehen, für 20h kultiviert (MLC). Nachfolgend wurden die Apoptoseraten der αβ T-Zellen mit einem Annexin V/7AAD Assay bestimmt. Als Kontrolle dienten reine aktivierte autologe PBMC Kulturen.

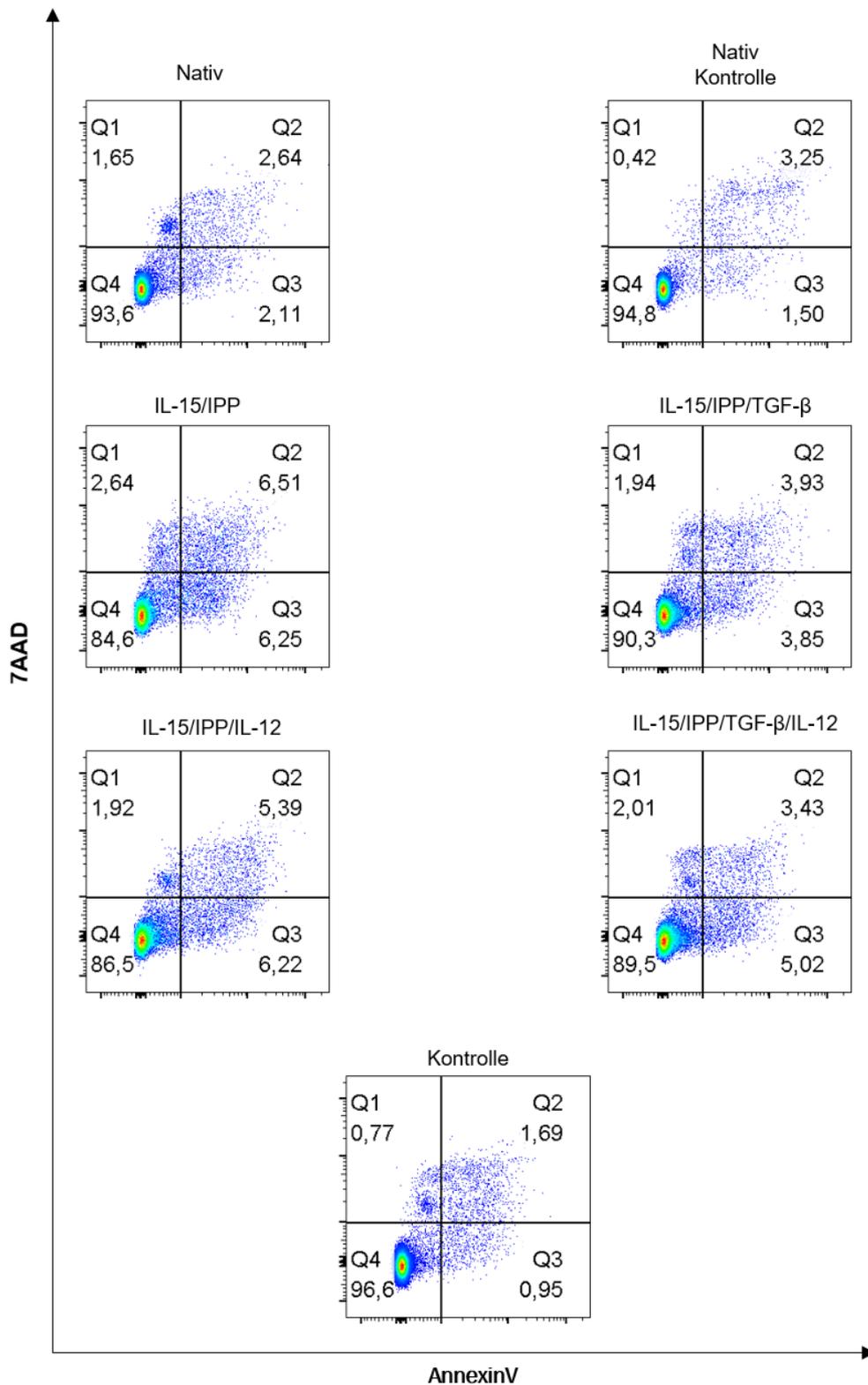


Abb. 6: AnnexinV/7AAD Assay aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen. Abgebildet sind prozentuale Anteile lebender (Q4), nekrotischer (Q1) sowie früh (Q3) - und apoptotischer (Q2) $\alpha\beta$ T-Zellen. Die $\alpha\beta$ T-Zellen wurden mit nativen und über 10 Tage stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen bzw. in der jeweiligen Kontrollgruppe bestehenden aus reinen aktivierten PBMCs, kokultiviert. Es handelt sich um einen repräsentativen Probanden.

Die durch V γ 9V δ 2 T-Zellen induzierten Apoptoseraten aktivierter autologer $\alpha\beta$ T-Zellen wurden wie folgt berechnet (EG, Experimentalgruppe; KG, Kontrollgruppe):

$$\text{Apoptoserate autologer } \alpha\beta \text{ T-Zellen [\%]} = \text{Apoptose EG} - \text{Apoptose KG}$$

In den Kontrollgruppen, die reine aktivierte PBMC Kulturen waren, zeigten $6,76 \pm 2,73$ % der $\alpha\beta$ T-Zellen aktivierungsbedingte Apoptosezeichen (der Annexin V/7AAD Assay markiert früh-apoptotische sowie apoptotische Zellen) (beispielhaft dargestellt in Abb. 6). $\alpha\beta$ T-Zellen in Kokultur mit nativen, isolierten V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigen somit keine signifikant höheren Apoptoseraten als reine, aktivierte PBMC Kulturen ($1,62 \pm 3,7$ % (s. Abb. 7) vs. $6,76 \pm 2,73$ % (nicht dargestellt)).

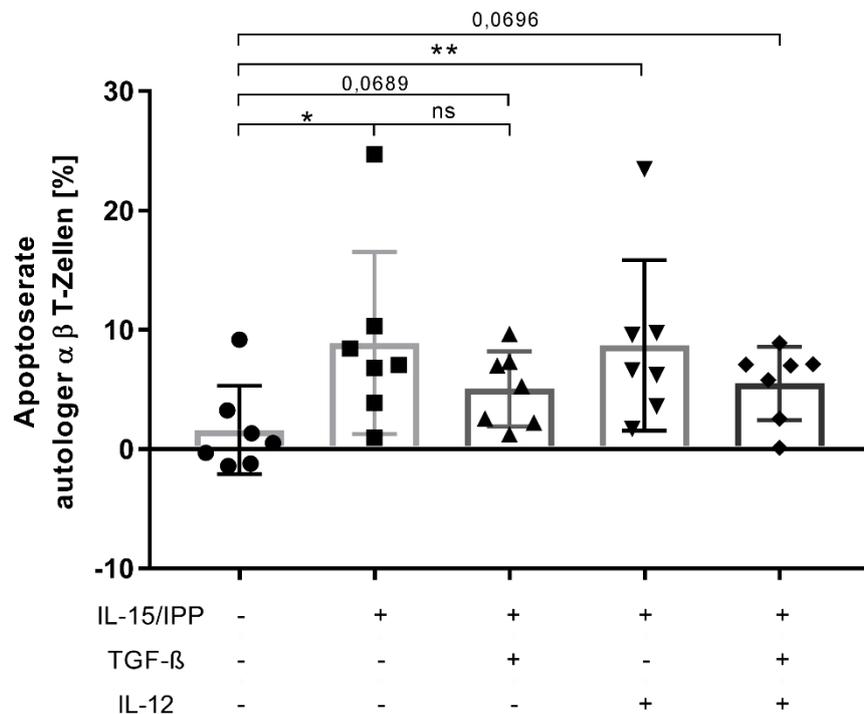


Abb. 7: Prozentualer Anteil früh- und apoptotischer $\alpha\beta$ T-Zellen in Kokultur mit nativen (-) und über 10 Tage stimulierten (+) V γ 9V δ 2 T-Zellen; Signifikanztestung: abhängiger t-Test mit „*“ für $p < 0,05$, „**“ für $p < 0,01$; Daten erstveröffentlicht in: *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)

In allen untersuchten Stimulationsgruppen zeigten aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen nach 20h Kokultur mit über ihren TZR simulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen erhöhte Apoptoseraten (teils nicht signifikant). IL-15/IPP bzw. IL-15/IPP/IL-12 stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen induzierten signifikant höhere Apoptoseraten in $\alpha\beta$ T-Zellen ($8,9 \pm 7,6$ % bzw. $8,7 \pm 7,1$ %) in MLCs im Vergleich zu nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen. Die

beobachteten Apoptoseraten der mit IL-15/IPP stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen betragen zwischen 0,96 % und 24,72 % (7 Probanden). Mit IL-15/IPP/IL-12 stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen zeigten ähnliche Apoptoseraten. Die Apoptoseraten von mit IL-15/IPP/IL-12 stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen und mit lediglich IL-15/IPP stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen korrelierten sehr stark ($p < 0,0001$) mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient $r = 0,99$ (nicht dargetstellt). Die Anwesenheit von IL-12 während der Stimulation der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen hatte damit keinen Einfluss auf die induzierten Apoptoseraten der kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen.

Nicht signifikant erhöht waren die Apoptoseraten von $\alpha\beta$ T-Zellen, die mit IL-15/IPP/TGF- β bzw. IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kokultiviert wurden ($p = 0,0689$ bzw. $p = 0,0696$). Jedoch korrelierten die Apoptoseraten beider Stimulationsgruppen miteinander ($p < 0,001$) (nicht dargetstellt). Die Anwesenheit von IL-12 während der Stimulation hatte auf das Apoptose-induzierende Potenzial von mit IL-15/IPP/TGF- β bzw. IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen keinen Einfluss. Beim Vergleich der Ansätze mit stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Induktion von Apoptose in kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen. Das durch die 10-tägige Stimulation erreichte effektive Apoptose-induzierende Potenzial, betrug in allen untersuchten Gruppen im Mittel zwischen 3,48 % (IL-15/IPP/TGF- β) und 7,28 % (IL-15/IPP). Den dafür verantwortlichen Wirkungsmechanismus untersuchten wir unter dem Gesichtspunkt folgender Parameter: Perforin/Granzyme B und Gimap4.

3.2.2 Gimap4 induziert keine Apoptose in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen

3.2.2.1 Gimap4 Proteinexpression

Um die beobachtete Apoptose von aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen, die mit IL-15/IPP bzw. IL-15/IPP/IL-12 $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kokultiviert wurden, zu erklären, hypothesierten wir einen Transfer der RasGTPase Gimap4 von den $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen zu den $\alpha\beta$ T-Zellen als Apoptose-induzierenden Mechanismus. Wir ermittelten daher den intrazellulären Gimap4 Proteingehalt von frisch isolierten und 10-tägig stimulierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen mittels FACS, um zu überprüfen, ob Gimap4⁺ $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen eher Apoptose in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen induzieren als Gimap4⁻ $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

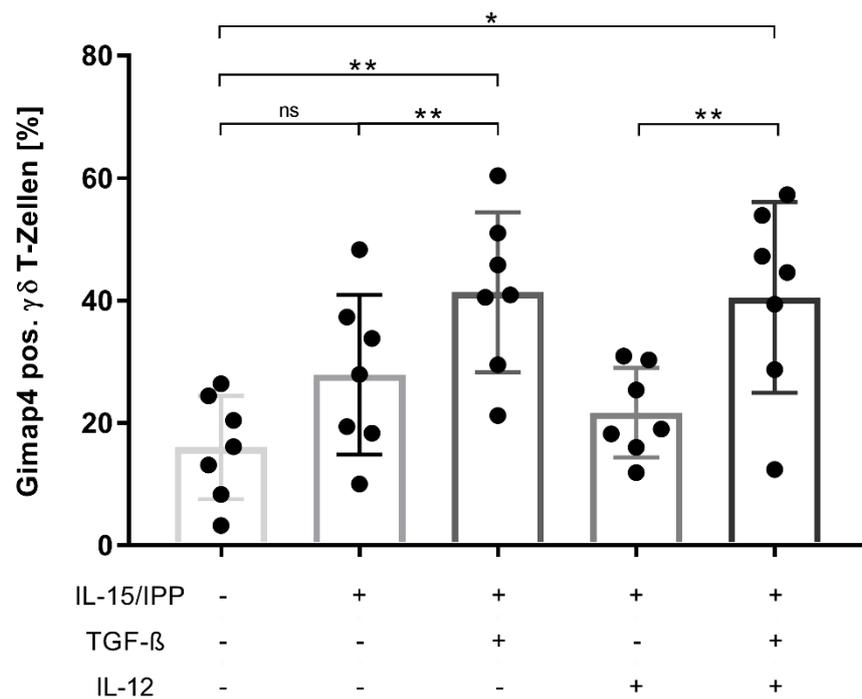


Abb. 8: Prozentualer Anteil Gimap4+ Vγ9Vδ2 T-Zellen in nativen (-) und stimulierten (+) Vγ9Vδ2 T-Zellen; Signifikanztestung: abhängiger t-Test mit „*“ für $p < 0,05$ bzw. „**“ für $p < 0,01$

Der Anteil an Gimap4+ Vγ9Vδ2 T-Zellen betrug in nativen Gruppen $16 \pm 8,4$ %. Die Stimulation mit IL-15/IPP ($27,8 \pm 13,1$ %) bzw. IL-15/IPP/IL-12 ($21,7 \pm 7,3$ %) steigerte den Anteil an Gimap4+ Vγ9Vδ2 T-Zellen in den untersuchten γδ T-Zellpopulationen nicht signifikant (s. Abb. 8). Mit IL-15/IPP/TGF-β stimulierte Vγ9Vδ2 T-Zellen wiesen eine signifikante Steigerung an Gimap4+ Vγ9Vδ2 T-Zellen auf ($41,3 \pm 13,1$ %). Im Vergleich der untersuchten Populationen zeigten mit IL-15/IPP/TGF-β stimulierte Vγ9Vδ2 T-Zellpopulationen ein signifikant höheres Gimap4 Expressionsniveau. Die zusätzliche Anwesenheit von IL-12 bei einer IL-15/IPP/TGF-β Stimulation konnte die TGF-β vermittelte Gimap4 Expressionssteigerung der Vγ9Vδ2 T-Zellen nicht antagonisieren. Zwischen den Stimulationsgruppen IL-15/IPP/TGF-β und IL-15/IPP/TGF-β/IL-12 bestand keine signifikante Korrelation in Bezug auf den Anteil der Gimap4+ Vγ9Vδ2 T-Zellen (nicht dargestellt) .

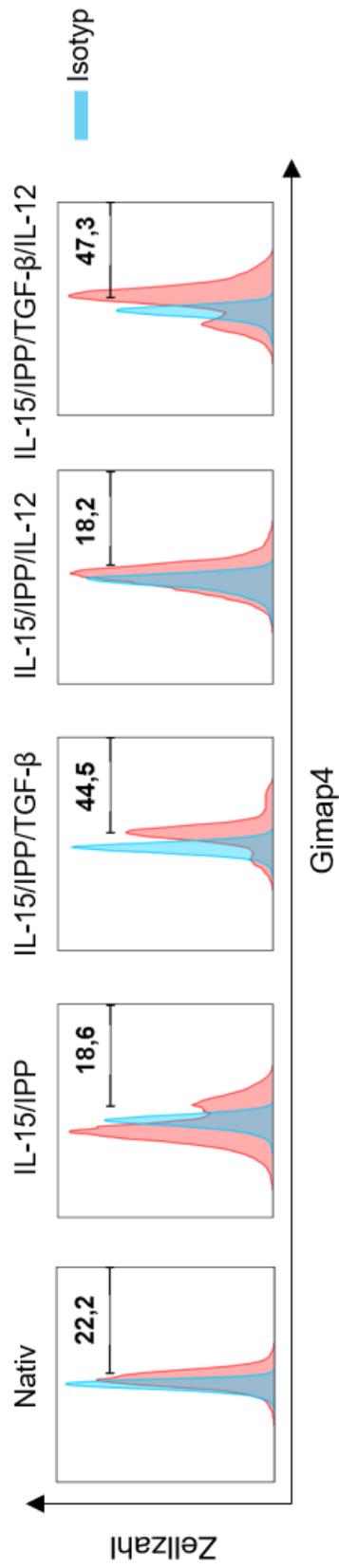


Abb. 9: Gimap4 Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen in nativen und 10 Tage stimulierten PBMCs. Es ist das Expressionsmuster eines repräsentativen Probanden dargestellt.

3.2.2.2 Gimap4 Expression in V γ 9V δ 2 T-Zellen korreliert nicht mit deren Potenzial zur Apoptoseinduktion

Nach der Bestimmung des Anteils an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen pro Kultur (beispielhaft in Abb. 9), korrelierten wir den Anteil an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen mit den jeweilig in den MLCs induzierten Apoptoseraten autologer $\alpha\beta$ T-Zellen (s. Abb. 10). Weiterhin bestimmten wir die Regressionsgerade, um herauszufinden, ob der Anteil an Gimap4⁺ Zellen einer V γ 9V δ 2 T-Zellpopulation eine Aussage über deren Induktion von Apoptose in kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen ermöglicht.

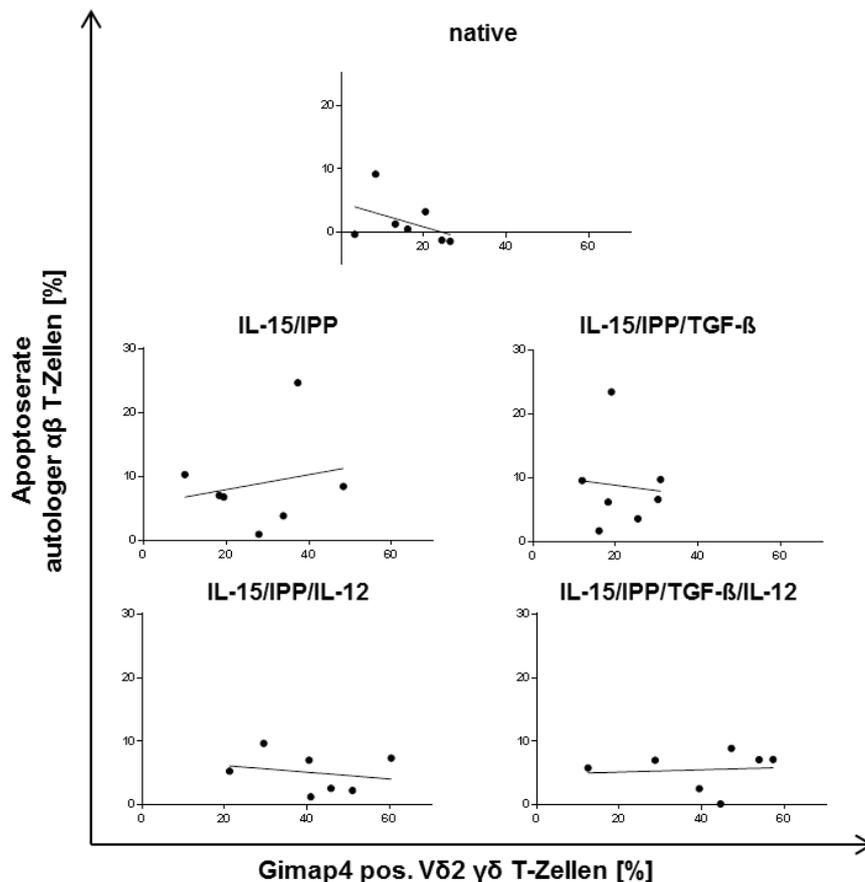


Abb. 10: Korrelation zwischen der Gimap4 Expression und der in Kokultur induzierten Apoptose von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen durch native und über 10 Tage stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen

Dabei zeigte sich, dass weder die nativen noch die stimulierten Versuchsgruppen signifikante Korrelationen zwischen dem Anteil an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen und deren Apoptoseinduktion in $\alpha\beta$ T-Zellen aufwiesen. D.h. V γ 9V δ 2 T-Zellpopulationen mit hohen Anteilen an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen induzierten nach 20h nicht mehr oder weniger Apoptose in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen als V γ 9V δ 2 T-Zellpopulationen mit niedrigen Anteilen an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen.

3.2.2.3 Gimap4 mRNA Expression

Weiterhin bestimmten wir die Gimap4 mRNA Expression der Tage 0 (Isolierung aus Vollblut) und 10 (Ende der Stimulation) von isolierten V γ 9V δ 2 T-Zellen mittels qPCR.

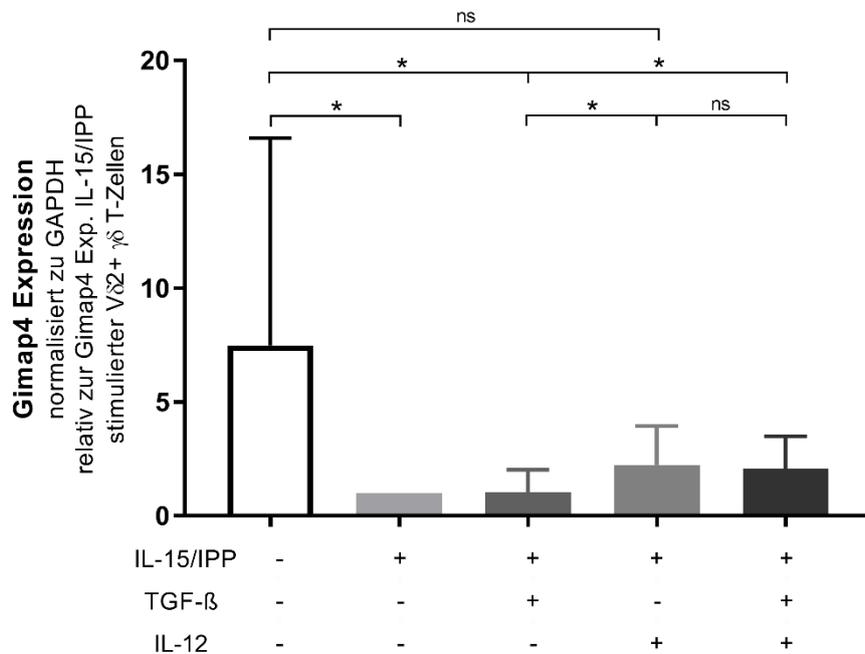


Abb. 11: Gimap4 mRNA Expression normalisiert zu GAPDH relativ zur Gimap4 Expression IL-15/IPP stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen. Untersucht wurden native (-) sowie verschiedenartig stimulierte (+) V γ 9V δ 2 T-Zellen. Signifikanztestung: Wilcoxon signed-rank Test mit „*“ für $p < 0,05$

Beim Vergleich der per FACS bestimmten intrazellulär Gimap4 Proteinexpression mit der per qPCR bestimmten Gimap4 mRNA Expression zeigten sich große Unterschiede (vgl. Abb. 8 mit Abb. 11). IL-15/IPP bzw. IL-15/IPP/ TGF- β stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigten signifikant geringere Gimap4 mRNA Expressionen als an Tag 0 isolierte V γ 9V δ 2 T-Zellen. Die Gimap4 mRNA Expressionen waren um das 7,48-fache (IL-15/IPP) bzw. 7,19-fache (IL-15/IPP/TGF- β) im Vergleich zu nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen verringert.

Die Gruppen IL-15/IPP/IL-12 bzw. IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 zeigten dagegen keine signifikanten Abnahmen der Gimap4 Expressionen gegenüber der nativen Gruppe. Dennoch zeigten native V γ 9V δ 2 T-Zellen tendenziell die höchsten mRNA Expressionen (nicht signifikant gegenüber IL-15/IPP/IL-12 mit $p=0,0625$).

Im Vergleich der 4 Gruppen untereinander wiesen die IL-12 stimulierten Gruppen eine signifikante Erhöhung (2,34-fach (IL-15/IPP/IL-12); 2,15-fach (IL-15/IPP/IL-12/ TGF- β)) der Gimap4 mRNA Expression zu IL-15/IPP stimulierten Versuchsgruppen auf.

Die Anwesenheit von TGF- β während der Stimulation zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Höhe der Gimap4 mRNA Expression im Vergleich zu IL-15/IPP stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen.

Zusammenfassend verhielten sich die in der qPCR ermittelten mRNA Expressionen genau konträr zu den im FACS ermittelten Anteilen an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen pro Kultur. Während in der FACS Analyse die Stimulation von V γ 9V δ 2 T-Zellen mit TGF- β den Anteil an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen in der Kultur zu erhöhen schien, konnte diese Beobachtung in der qPCR nicht bestätigt werden. Vielmehr hatte eher IL-12 einen positiven Einfluss auf die in der qPCR bestimmte Expressionshöhe bzw. zeigten native V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen tendenziell das höchste Gimap4 Expressionsniveau.

3.2.3 Perforin und Granzyme B als möglicher zytotoxischer Wirkmechanismus

3.2.3.1 Perforin und Granzyme B mRNA Expression Erstveröffentlichung in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)

Neben der Hypothese des Gimap4 Transfers zwischen V γ 9V δ 2 T-Zellen und $\alpha\beta$ T-Zellen, hypothesierten wir den oft beschriebenen Granzyme B/Perforin Weg als weiteren möglichen Mechanismus für die von uns beobachtete Apoptoseinduktion in autologen $\alpha\beta$ T-Zellen. Mittels qPCR bestimmten wir die mRNA Expressionsniveaus von Perforin und Granzyme B sowohl vor (Tag 0) wie auch nach (Tag 10) der Stimulation. Als Referenzgruppe diente die Stimulationsgruppe IL-15/IPP (festgelegtes Expressionsniveau = 1).

In ihrem Expressionsmuster unterschieden sich die mRNA Expressionsmuster beider Proteine aufgrund ihrer funktionellen Koexistenz nur wenig. Von nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen war die Granzyme B Expression nicht, jedoch die Perforin Expression signifikant gegenüber der Referenzgruppe erhöht.

Alle Granzyme B Expressionen der untersuchten V γ 9V δ 2 T-Zellgruppen waren gegenüber der Granzyme B Expression nativer V γ 9V δ 2 T-Zellen nicht signifikant verändert. Bei der Perforin Expression ließ sich dagegen eine signifikante Abnahme der Expression bei der Stimulation mit IL-15/IPP und IL-15/IPP/TGF- β im Vergleich zu der Expression von nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen feststellen.

Die Stimulation mit IL-15/IPP/IL-12 zeigte eine im Vergleich zu den anderen untersuchten stimulierten Gruppen signifikant höhere Expression der Granzyme B als auch der Perforin Expression. Im Vergleich zu nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen unterschieden

sich diese jedoch nicht signifikant. Spannenderweise ist die Granzyme B und Perforin Expression von IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen zwar signifikant geringer als von IL-15/IPP/IL-12 stimulierten, jedoch auch signifikant höher (Perforin 1,83-fach ; Granzyme B 2,64-fach) als von IL-15/IPP/TGF- β stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen.

Weder der alleinige IPP vermittelte TZR Stimulus noch die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β während der 10-tägigen Stimulation führten zu einer Expressionssteigerung von Granzyme B oder Perforin. Native V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigen tendenziell ein höheres Granzyme B und Perforin Expressionsniveau.

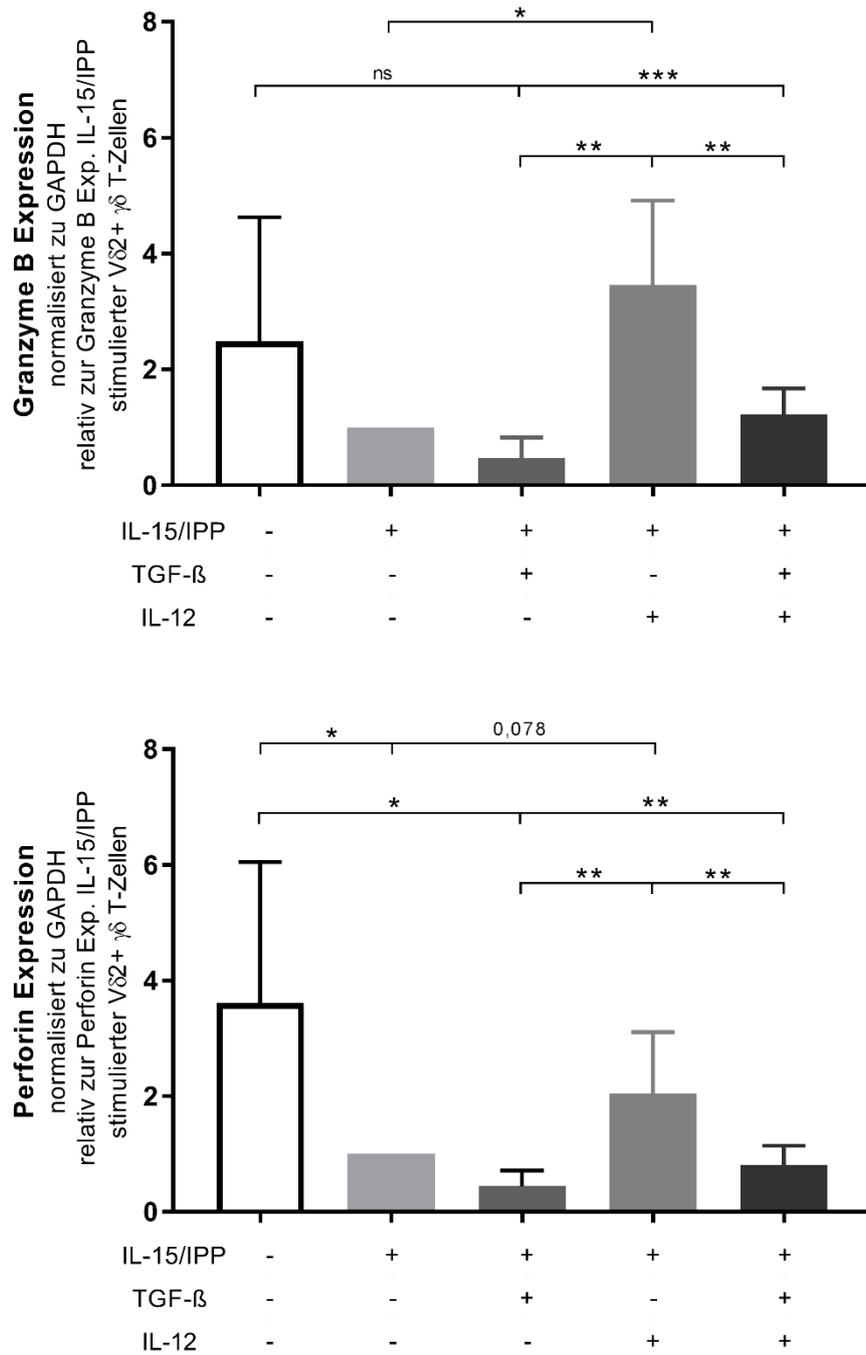


Abb. 12: Perforin und Granzyme B Expression (normalisiert zu GAPDH) relativ zur Perforin bzw. Granzyme B Expression IL-15/IPP stimulierter Vδ2 T-Zellen; Signifikanztestung: abhängiger t-Test mit „*“ für $p < 0,05$ bzw. „**“ für $p < 0,01$;
 Daten erstveröffentlicht in: *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)

3.2.3.2 Perforin/Granzyme B mRNA Expression korreliert nicht mit dem Apoptose-induzierendem Potenzial von V γ 9V δ 2 T-Zellen Erstveröffentlichung in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)

Um den Zusammenhang zwischen der Perforin bzw. Granzyme B mRNA Expression und der Induktion von Apoptose zu untersuchen, korrelierten wir die mRNA Expressionen (normalisiert zu GAPDH) der V γ 9V δ 2 T-Zellpopulationen mit ihren in Kokultur induzierten Apoptoseraten autologer aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen.

In allen untersuchten Gruppen konnte keine Signifikanz zwischen der Granzyme B bzw. Perforin mRNA Expression und den Apoptoseraten der autologen aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen festgestellt werden. Somit kann weder die mRNA Expression von Perforin noch von Granzyme B als Marker für das Apoptose-induzierende Potenzial einer V γ 9V δ 2 T-Zellkultur gelten.

Stattdessen konnten interessanterweise niedrigere Apoptoseraten autologer $\alpha\beta$ T-Zellen beobachtet werden, wenn native $\gamma\delta$ T-Zellen eine höhere Perforin Expression aufwiesen (signifikante Korrelation mit $r = -0,86$).

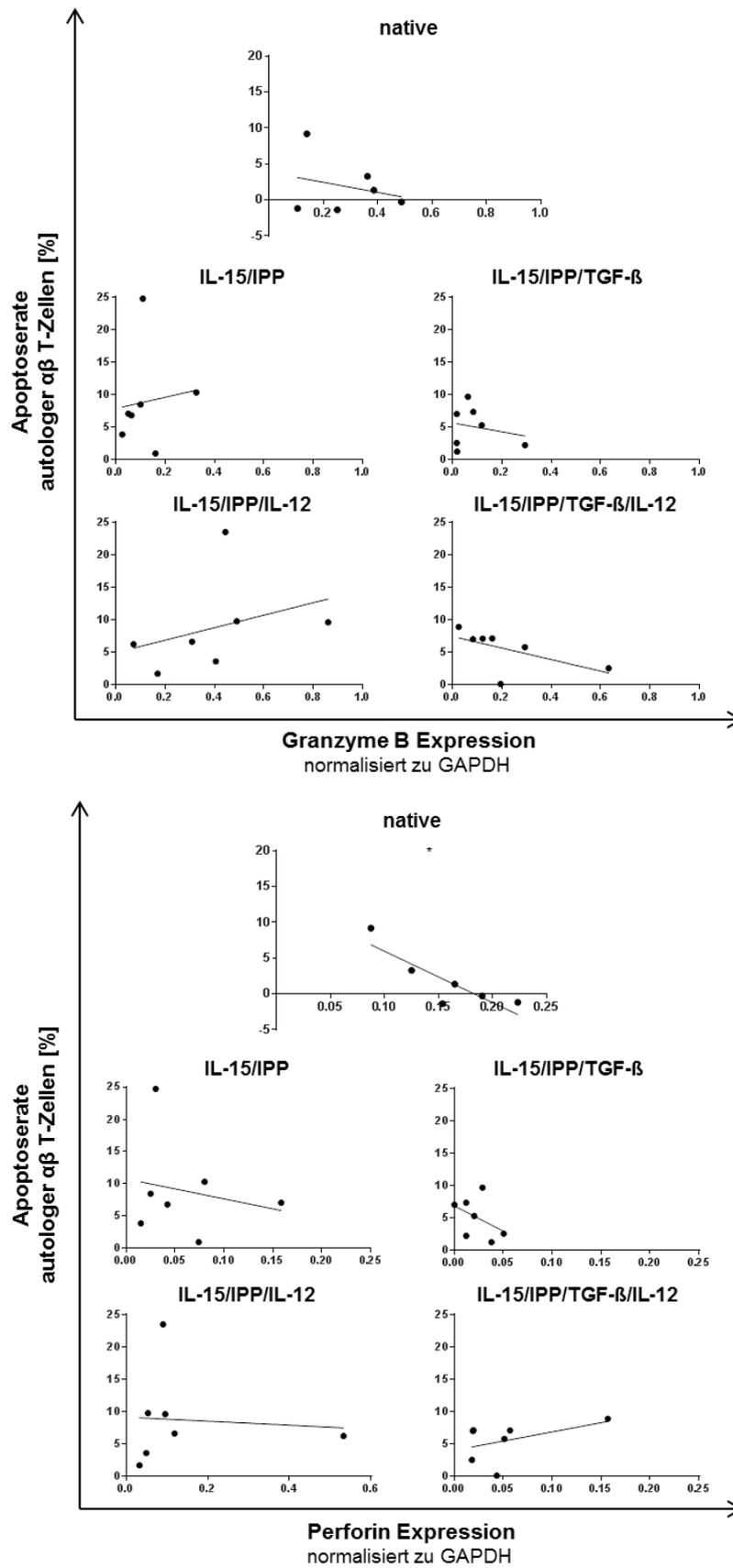


Abb. 13: Korrelation von der Granzyme B bzw. Perforin Expression mit der durch Kokultur induzierter Apoptoserate autologer $\alpha\beta$ T-Zellen durch native und über 10 Tage stimulierte V δ 2 T-Zellen; Daten erstveröffentlicht in: *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)

3.3 Immunsuppressives Potenzial von V γ 9V δ 2 T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen

3.3.1 Aktivierte V γ 9V δ 2 T-Zellen supprimieren $\alpha\beta$ T-Zellproliferation Erstveröffentlichung

in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)

Neben dem zytotoxischen Potenzial untersuchten wir weiterhin das immunsuppressive Potenzial von über ihren TZR positiv isolierten V γ 9V δ 2 T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen. Nach 72-stündiger Kokultur von nativen bzw. stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen mit aktivierten autologen PBMCs wurde mittels einem CFSE Assay die Proliferation der anti-CD3/28 aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen bestimmt. Anhand der Proliferationsraten der Kontrollgruppen wurde die von V γ 9V δ 2 T-Zellen induzierte Inhibition der Proliferation (Suppression) der autologen $\alpha\beta$ T-Zellen berechnet (EG, Experimentalgruppe; KG, Kontrollgruppe):

$$\text{Suppression autologer } \alpha\beta \text{ T – Zellen [\%]} = 1 - \frac{\text{Proliferation KG}}{\text{Proliferation EG}}$$

Die Kontrollgruppen bestanden aus reinen anti-CD3/CD28 aktivierten PBMC Kulturen, die nach 72h einen Anteil an 49,85 \pm 12,56 % proliferierten $\alpha\beta$ T-Zellen aufwiesen (beispielhaft in Abb. 14). Definitionsbedingt zeigten die Kontrollgruppen 0 % Suppression der autologen $\alpha\beta$ T-Zellen.

Weiterhin wurden, wie vom Hersteller des CFSE Assays empfohlen, Kontrollen mit nicht aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen durchgeführt.

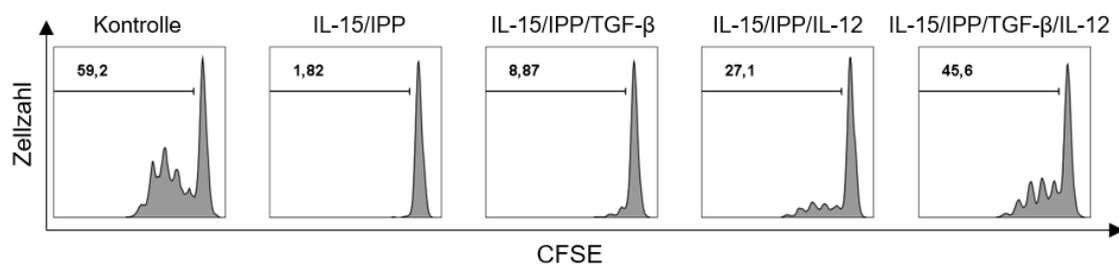


Abb. 14: Proliferation autologer CFSE markierter anti-CD3/CD28 aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen (dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierter $\alpha\beta$ T-Zellen an der Gesamtpopulation) nach 72h Kokultur mit verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen bzw. frisch isolierten PBMCs (Kontrolle). Es ist der Proliferationsassay eines repräsentativen Probanden dargestellt.

Analog zu Vorarbeiten wurde ein immunsuppressives Potenzial als eine weniger als 50%ige Proliferation der kokultivierten $\alpha\beta$ T-Zellen definiert. $\gamma\delta$ T-Zellen mit einem immunsuppressiven Potenzial werden als $\gamma\delta$ Treg-Zellen bezeichnet, da sie suffizient die Immunantworten von $\alpha\beta$ T-Zellen herunterregulieren.

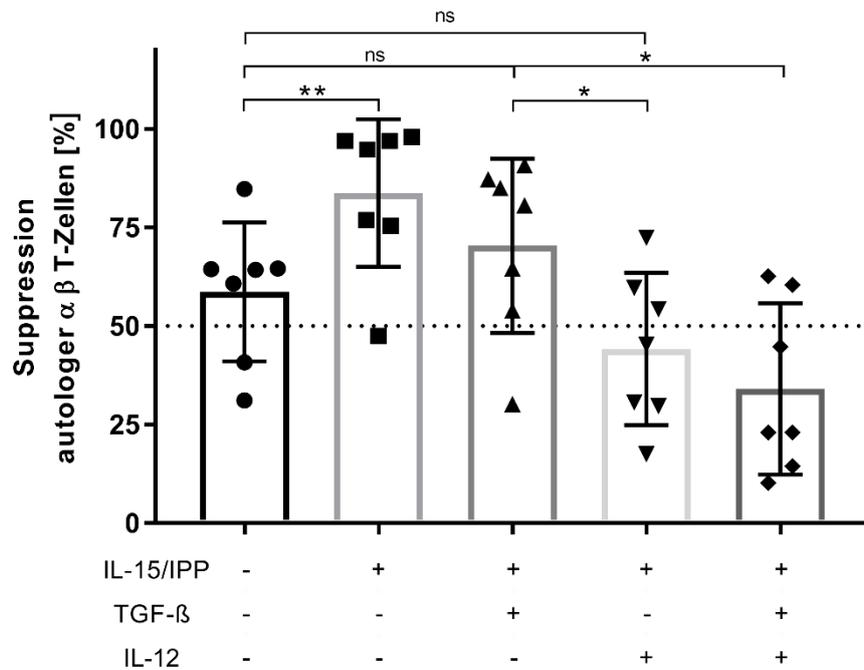


Abb. 15: Suppression anti-CD3/CD28 aktivierter autologer $\alpha\beta$ T-Zellen nach 72h Kokultur mit nativen (-) bzw. stimulierten (+) $V\delta 2$ T-Zellpopulationen. Als suppressive $V\delta 2$ T-Zellpopulationen gilt eine Suppression > 50 %; Signifikanztestung: Wilcoxon signed-rank Test (IL-15/IPP) und abhängiger t-Test mit „*“ für $p < 0,05$ bzw. „**“ für $p < 0,01$;

Daten erstveröffentlicht in: *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)

Dieser Definition folgend wiesen lediglich IL-15/IPP ($83,75 \pm 18,71$ %) stimulierte $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ein signifikant immunsuppressives Potenzial ($p=0,003$) auf. IL-15/IPP/TGF- β ($70,33 \pm 22,11$ %) stimulierte $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen verfehlten diese Trennlinie knapp ($p=0,051$). In der Stimulationsgruppe IL-15/IPP/TGF- β zeigten die aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen von 6/7 Probanden eine Suppression >50 %. Vier von den sechs suppressiven $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellpopulationen der IL-15/IPP/TGF- β Stimulationsgruppe wirkten sehr suppressiv auf die autologen $\alpha\beta$ T-Zellen (>80 %). In den beiden restlichen suppressiven Ansätzen lagen geringere Suppressionsraten vor ($64,59$ %; $53,94$ %).

Alle Stimulationsgruppen zeigten gruppenintern große Differenzen zwischen der niedrigsten und der höchsten beobachteten Suppression autologer $\alpha\beta$ T-Zellen

(Native: 31,14-84,76 %; IL-15/IPP: 47,47-97,93 %; IL-15/IPP/TGF- β : 30,21-90,78 %; IL-15/IPP/IL-12: 17,51-72,35 %; IL-15/IPP/IL-12/TGF- β : 10,19-62,62 %). Wir teilten daher die einzelnen Stimulationsgruppen in weitere Untergruppen ein: (1) IL-15/IPP/IL-12/TGF- β und IL-15/IPP/IL-12 stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen wurden in wenig suppressive (>50 %) und nicht suppressive (<50 %), (2) IL-15/IPP und IL-15/IPP/TGF- β stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen in stark suppressive (>80 %), suppressive (<80 %) und nicht suppressive (<50 %) Untergruppen eingeteilt.

Von besonderer Bedeutung ist, dass die lediglich über ihren TZR mit IL-15/IPP stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen die stärkste Suppression (>94 % Inhibition bei 4/7 Probanden) aller Gruppen zeigten. Dieses suppressive Potenzial ist signifikant höher als das der positiv isolierten nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen ($p=0,007$), nicht jedoch als das der IL-15/IPP/TGF- β stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen. Die Anwesenheit von TGF- β bei der IL-15/IPP/TGF- β Stimulation hat weder einen positiven noch negativen Effekt auf die Induktion des suppressiven Potenzials der V γ 9V δ 2 T-Zellen.

Die Anwesenheit vom stark T-Zell aktivierenden Zytokin IL-12 zeigte bei der IL-15/IPP/IL-12 Stimulation einen negativen Effekt (52,75 % des Potenziales von IL-15/IPP) auf das suppressive Potenzial der stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen ($44,19 \pm 19,33$ %). Im Vergleich zu nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen ist jedoch das suppressive Potenzial von IL-15/IPP/IL-12 stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen nicht signifikant erniedrigt ($p=0,17$). Bei der zusätzlichen Anwesenheit von TGF- β ist das suppressive Potenzial ($34,05 \pm 21,7$ %) der V γ 9V δ 2 T-Zellen stärker vermindert (zu nativen $p=0,017$). Die Anwesenheit von TGF- β während der Stimulation hat keinen Effekt bzw. wirkt eher verstärkend auf den von IL-12 vermittelten Effekt der geringeren Suppressivität ($p=0,35$).

3.3.2 FoxP3 und Gimap4 sind keine Marker für $\gamma\delta$ Treg-Zellen

3.3.2.1 FoxP3 Expression von V γ 9V δ 2 T-Zellen Erstveröffentlichung in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Forkhead Box Gene Familie, der konstitutiv aus dem Thymus entstammenden nTreg-Zellen exprimiert wird. FoxP3 gilt als Marker eines suppressiven T-Zell-Phänotyps.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher, FoxP3 als Marker für suppressive V γ 9V δ 2 T-Zellen zu überprüfen. Es wurde mittels qPCR das FoxP3 Expressionniveau positiv isolierter V γ 9V δ 2 T-Zellen vor und nach der 10-tägigen Stimulation bestimmt.

Native V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigten sehr geringe FoxP3 mRNA Expressionen (s. Abb 16). Nach 10-tägiger Stimulation mit IL-15/IPP/IL-12 zeigten V γ 9V δ 2 T-Zellen eine signifikante Steigerung (6,0-fach zur nativen Expression) ihrer FoxP3 Expression (s. Abb 16 A). Bei der alleinigen Stimulation mit IL-15/IPP war dieser Effekt nicht zu beobachten. IL-12 regulierte signifikant die FoxP3 Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen hoch. Die Stimulation mit IL-15/IPP/TGF- β führte ebenfalls zu einer signifikanten FoxP3 Expressionssteigerung. Diese ist jedoch geringer ausgeprägt (2,0-fach gegenüber nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen) im Vergleich zu der Stimulation mit IL-15/IPP/TGF- β /IL-12. Bei der Stimulation mit einem tolerogenen (TGF- β) und einem T_H1 Zytokin (IL-12) überwiegt die FoxP3 expressionssteigernde Wirkung des IL-12.

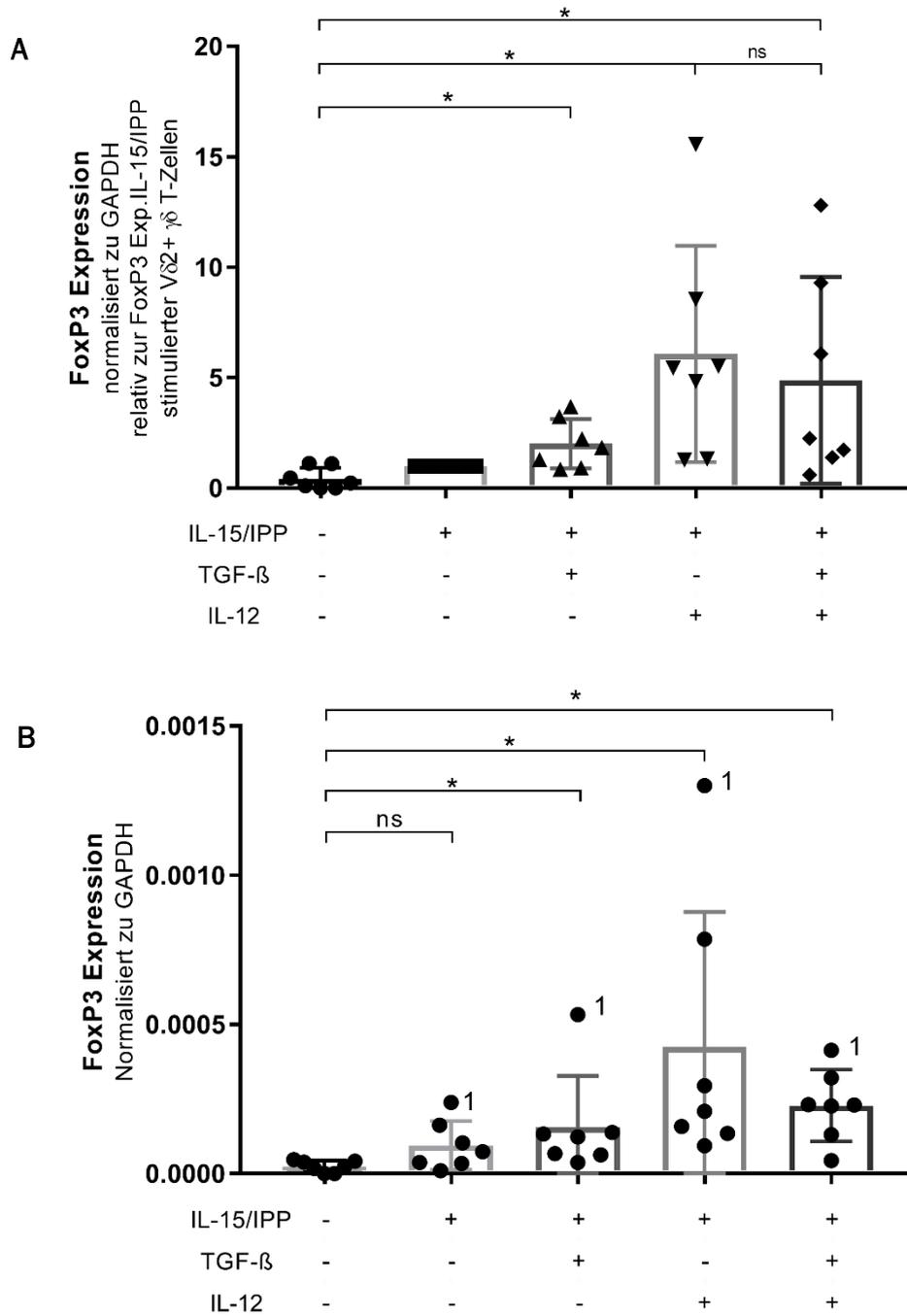


Abb. 16: FoxP3 Expression in nativen (-) und stimulierten (+) Vδ2 T-Zellen normalisiert zu GAPDH und relativ zur FoxP3 Expression IL-15/IPP stimulierter Vδ2 T-Zellen (A) und normalisiert zu GAPDH (B). (1) entspricht den Werten eines Probanden, der erhöhte Werte aufwies. Signifikanztestung: Wilcoxon signed-rank Test (IL-15/TGF-β und IL-15/IL-12) bzw. abhängiger t-Test mit „*“ für $p < 0,05$ Daten erstveröffentlicht in: *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)

3.3.2.2 FoxP3 Expression korreliert nicht mit suppressivem Potenzial

Erstveröffentlichung in: Cancer Immunol. Immunother. (2020)

Um FoxP3 als Marker für suppressive V γ 9V δ 2 T-Zellen zu untersuchen, korrelierten wir das mittels qPCR ermittelte FoxP3 Expressionsniveau (s. Abb 16 B). mit der Suppressionsleistung der V γ 9V δ 2 T-Zellen.

Wir konnten FoxP3 nicht als Marker für $\gamma\delta$ Treg-Zellen bestätigen. IL-15/IPP und IL-15/IPP/TGF- β stimulierte V γ 9V δ 2 -Zellen zeigten starke suppressive Phänotypen, jedoch korrelierte ihre FoxP3 Expression nicht positiv mit ihrer induzierten Suppression. Vielmehr ermittelten wir eine negative Korrelation von IL-15/IPP/TGF- β stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen für deren Suppression autologer aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen und ihrer FoxP3 Expression ($r=-0,805$, $p=0,029$). D.h. bei hoher FoxP3 Expression waren die IL-15/IPP/TGF- β stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen weniger suppressiv. Bei allen untersuchten Gruppen konnte keine positive Korrelation ermittelt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die FoxP3 Expression bei suppressiven $\gamma\delta$ Treg-Zellen daher nicht analog zu $\alpha\beta$ Treg-Zellen als Marker für einen suppressiven Phänotyp gilt. FoxP3 wird vielmehr in Anwesenheit von IL-15/IPP und IL-12 in V γ 9V δ 2 T-Zellen exprimiert, was für eine aktivierungsabhängige Expression spricht.

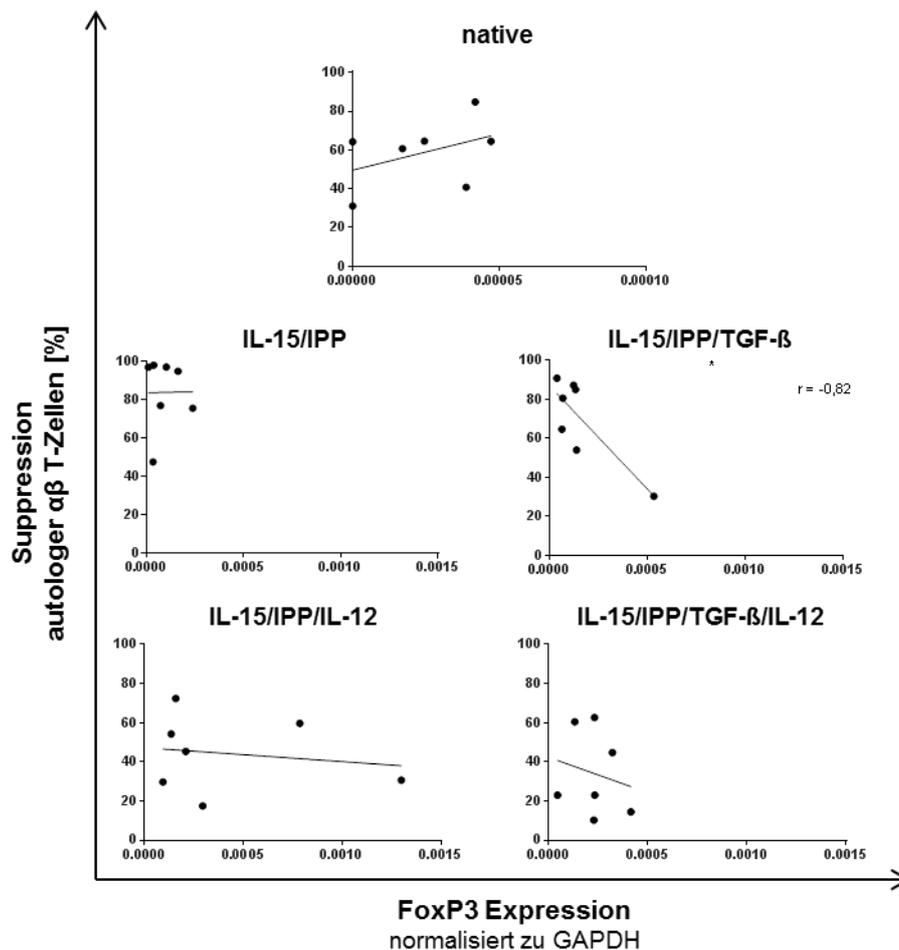


Abb. 17: Korrelation der FoxP3 Expression (zu GAPDH normalisiert) von nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellpopulationen und deren Suppression anti-CD3/CD28 aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen nach 72h Kokultur; „*“ für $p < 0,05$; Daten erstveröffentlicht in: *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)

3.3.2.3 Gimap4 Expression korreliert nicht mit suppressivem Potenzial

Bisher gibt es keine Hinweise, dass eine erhöhte Gimap4 Expression in V γ 9V δ 2 T-Zellen ein Marker für $\gamma\delta$ Treg-Zellpopulationen ist.

Die Suppressivität von IL-15/IPP/TGF- β stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigte einen starken positiven Zusammenhang ($r=0,928$, $p=0,0025$) mit dem Anteil positiver Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen: Bestand eine Kultur aus einem hohen Anteil an Gimap4⁺ Zellen, wies diese ein suppressives Potenzial auf (s. Abb 18).

Dieser Effekt konnte ebenfalls, jedoch schwächer, bei IL-15/IPP/IL-12 stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen beobachtet werden ($r=0,842$, $p=0,018$). Bei IL-15/IPP, IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 stimulierten und nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen ergaben sich dagegen keine signifikanten Korrelationen.

Für die suppressivste $\gamma\delta$ Treg-Zellpopulation (IL-15/IPP stimuliert) ergab sich allerdings kein Zusammenhang zwischen dem Anteil an positiven Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen und ihrem suppressiven Potenzial. Damit kann Gimap4 analog zu FoxP3 nicht als Marker für $\gamma\delta$ Treg-Zellen gelten.

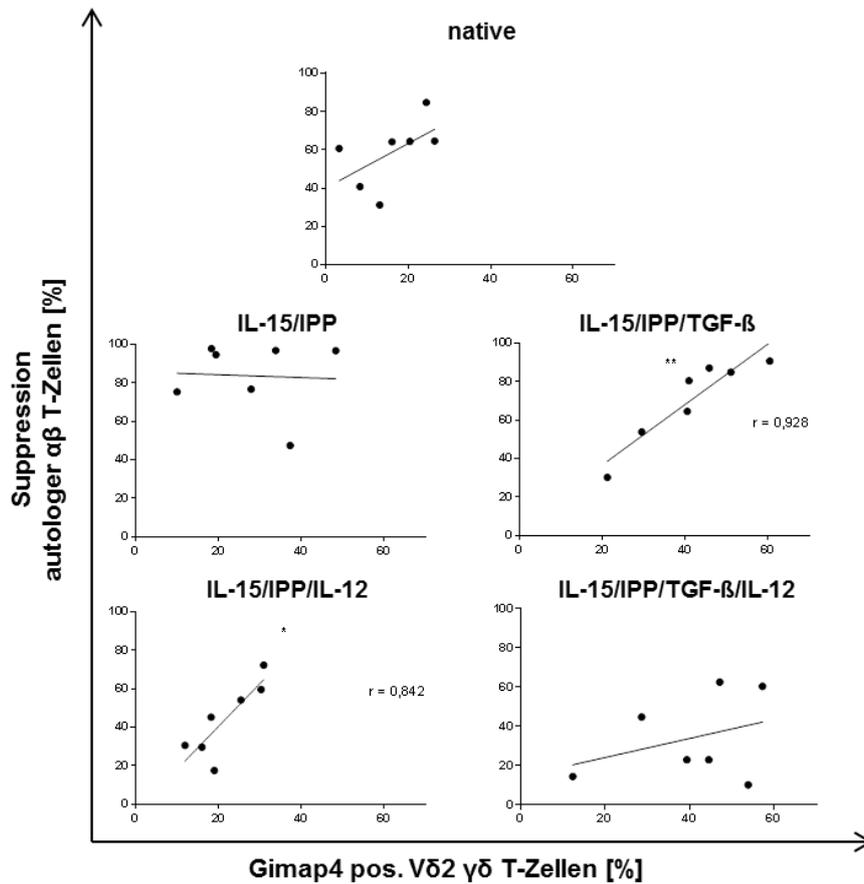


Abb. 18: Korrelation vom Anteil Gimap4⁺ V δ 2 T-Zellen/Kultur mit der induzierten Suppression autologer anti-CD3/CD28 aktivierter $\alpha\beta$ T-Zellen nach 72h Kokultur; „*“ für $p < 0,05$ bzw. „**“ für $p < 0,01$

3.4 Interferon- γ Expression

3.4.1 IL-12 induziert IFN- γ Expression

Nach einem TZR Stimulus wie ihn z.B. IPP generiert, exprimieren aktivierte V γ 9V δ 2 T-Zellen die T_H1 typischen Zytokine IFN- γ und TNF- α . Anhand einer qPCR untersuchten wir die IFN- γ mRNA Expression nativer und stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen.

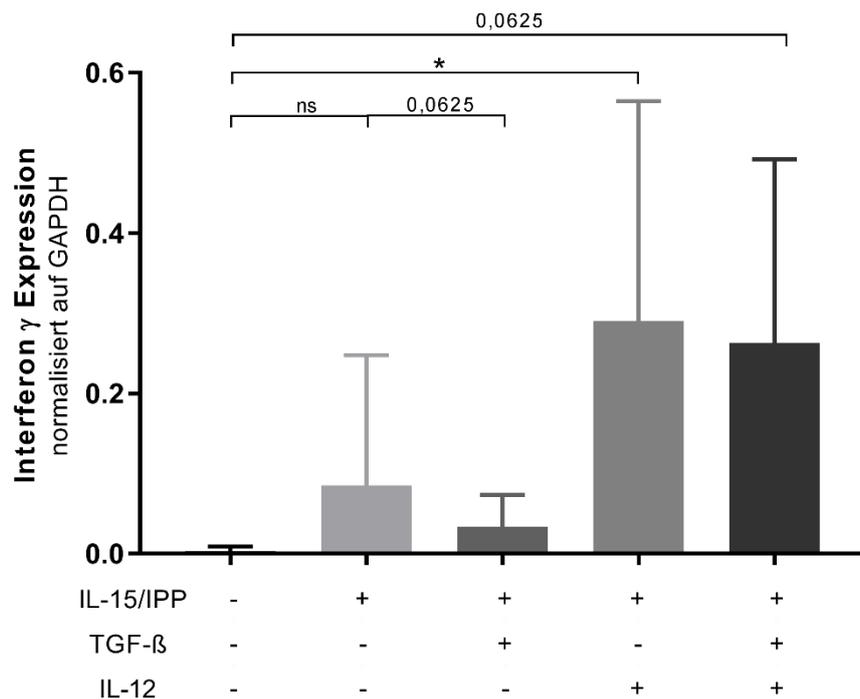


Abb. 19: IFN- γ Expression (normalisiert zu GAPDH) nativer (-) und 10-tägig stimulierter (+) V δ 2 T-Zellen
Signifikanztestung: Wilcoxon signed-rank Test mit „*“ für $p < 0,05$

Native, unstimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigten von den untersuchten Gruppen das niedrigste IFN- γ Expressionsniveau. Bei 2 Probanden lag die Expression unterhalb der Nachweisgrenze (daher native: n=5). IL-15/IPP/IL-12 stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen exprimierten im Vergleich zu unstimulierten signifikant mehr IFN- γ (4/7 Probanden wiesen stark erhöhte IFN- γ Expressionsniveaus aus). Die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β bei der IL-15/IPP/IL-12/TGF- β Stimulation modulierte die IFN- γ mRNA Expression nicht (4/7 Probanden wiesen erhöhte IFN- γ Expressionsniveaus auf). Allerdings zeigte die IFN- γ mRNA Expression IL-15/IPP/IL-12/TGF- β stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen keinen signifikanten Unterschied zu der der unstimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen ($p=0,0625$). Ein TZR Stimulus in Anwesenheit von IL-15 führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ mRNA Expression gegenüber nativen V γ 9V δ 2 T-

Zellen. Bei TGF- β Anwesenheit (Stimulationsgruppe IL-15/IPP/IL-12/TGF- β) nahm die IFN- γ Expression leicht ab ($p=0,0625$), was als Trend gewertet werden könnte.

In allen stimulierten Gruppen zeigten sich große Spender-individuelle Unterschiede im IFN- γ Expressionsniveau. Es zeigte sich, dass ein Proband (von sieben) einen T_H1 typischen Phänotyp mit einer IFN- γ Expression unter TZR vermittelter Stimulation entwickelte.

3.4.2 Interferon- γ Expression korreliert nicht mit der Expression von Gimap4

Um einen Zusammenhang zwischen der IFN- γ und Gimap4 Expression zu untersuchen, korrelierten wir den Anteil an Gimap4⁺ Zellen im FACS pro Kulturansatz mit den in der qPCR bestimmten IFN- γ mRNA Expressionswerten.

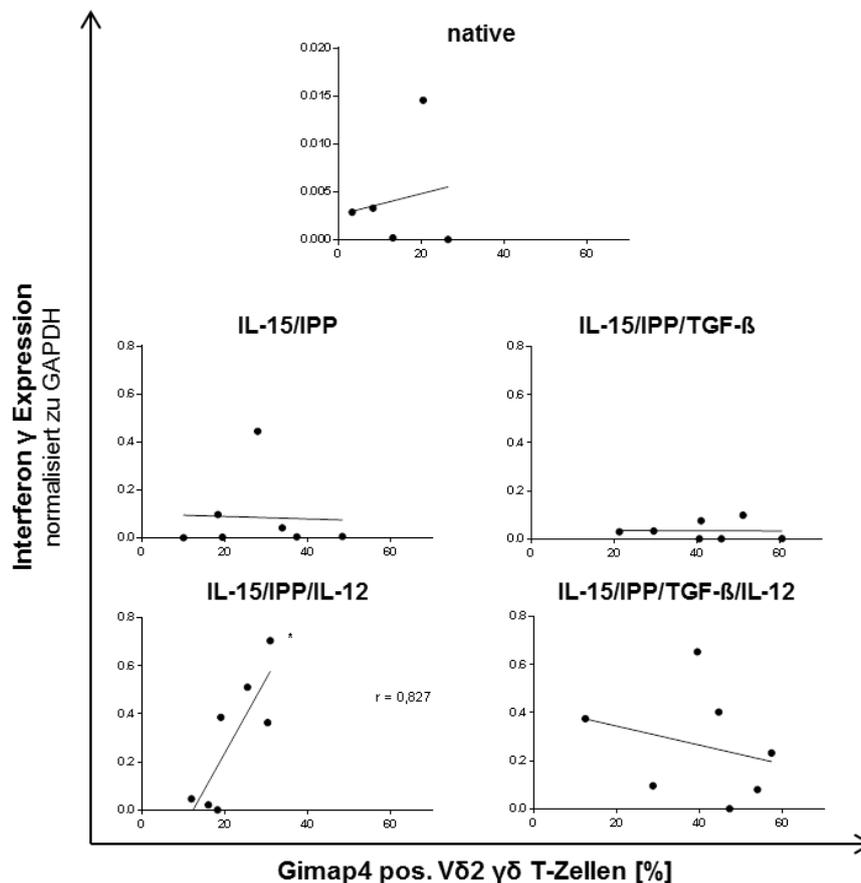


Abb. 20: Korrelation zwischen der IFN- γ Expression (GAPDH normalisiert) nativer und stimulierter V δ 2 T-Zellpopulationen und deren Anteil an Gimap4⁺ V δ 2 T-Zellen; „*“ für $p < 0,05$

Bis auf bei IL-15/IPP/IL-12 stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigten sich in den untersuchten Stimulationsgruppen keine Hinweise für eine Korrelation zwischen der Anzahl an Gimap4⁺ Zellen einer Kultur und ihrer IFN- γ mRNA Expression. Für die IL-

IL-15/IPP/IL-12 stimulierte V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellpopulation ergab sich dagegen ein starker positiver Zusammenhang ($r=0,827$, $p=0,022$) zwischen der Anzahl an Gimap4⁺ Zellen einer Kultur und deren IFN- γ mRNA Expression.

3.5 T-bet und Eomesodermin Expression

3.5.1 T-bet mRNA Expression

Da IL-12 in der Literatur als inverser Regulator der T-bet Expression beschrieben wird, ist es von Interesse den Einfluss der zusätzlichen Anwesenheit von IL-12 während der TZR vermittelten Stimulation der V γ 9V δ 2 T-Zellen auf deren T-bet Expression zu untersuchen.¹²⁵ Anhand der qPCR ermittelten wir das T-bet Expressionsniveau vergleichend zur Referenzgruppe IL-15/IPP (Wert=1) vor (nativ, unstimuliert) und nach 10-tägiger Stimulation (IPP vermittelte TZR Stimulation in Anwesenheit verschiedener Zytokinkombinationen).

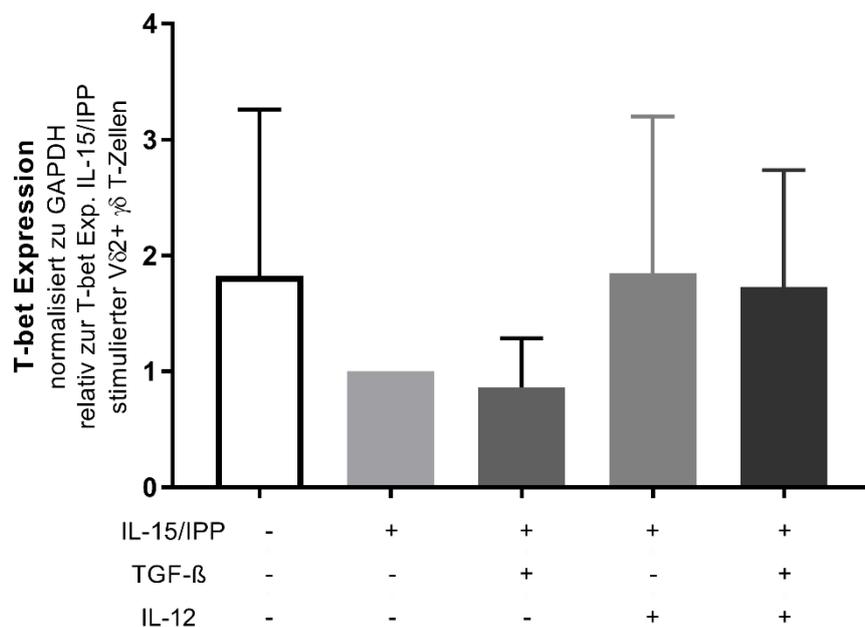


Abb. 21: T-bet Expression in nativen (-) und stimulierten (+) V δ 2 T-Zellpopulationen normalisiert zu GAPDH relativ zur T-bet Expression IL-15/IPP stimulierter V δ 2 T-Zellen; Signifikanztestung: abhängiger t-Test

Stimulationsgruppen ohne IL-12 zeigten übereinstimmend damit nach 10 Tagen tendenziell (jedoch nicht signifikant) geringere T-bet Expressionsniveaus als native oder IL-15/IPP/IL-12 bzw. IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 stimulierte V γ 9V δ 2 T-Zellen.

Insgesamt zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede in der T-bet Expression von mit IPP über den TZR stimulierten und frisch entnommenen V γ 9V δ 2 T-Zellen in Bezug auf die Transkription des IFN-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet (exemplarisch für IL-15/IPP/TGF- β zu nativen V γ 9V δ 2 T-Zellen: $p=0,273$).

3.5.2 Korrelationen zwischen der T-bet Expression und der Interferon- γ Expression bzw. dem Anteil Gimap4+ V γ 9V δ 2 T-Zellen

3.5.2.1 Bei IL-15/IPP stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen korreliert die T-bet Expression mit der Interferon- γ Expression

Wie bereits in 3.5.1 beschrieben, spielt der Transkriptionsfaktor T-bet eine wichtige Rolle in der Regulation der IFN- γ Expression in T-Zellen. Um einen Zusammenhang zwischen der Expression von T-bet und dem Zytokin IFN- γ zu bestätigen, korrelierten wir die in der qPCR ermittelten, auf GAPDH normalisierten Expressionen von T-bet und IFN- γ miteinander.

Die mRNA Expressionsniveaus für die an Tag 10 der Stimulation ermittelten T-bet und IFN- γ Transkription IL-15/IPP stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen zeigten eine Korrelation ($p=0,034$). Der Regressionskoeffizient $r=0,791$ verdeutlicht, dass höhere T-bet Expressionen mit höheren IFN- γ Expressionen bei IL-15/IPP stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen einhergehen.

Die von den Stimulationsvarianten IL-15/IPP/TGF- β bzw. IL-15/IPP/TGF- β /IL-12 errechneten p-Werte ($p=0,0537$ bzw. $p=0,0569$) von T-bet und IFN- γ Expression erreichen jedoch nur knapp keine Signifikanz (Signifikanzgrenze $p<0,05$). In nativen und IL-15/IPP/IL-12 stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen ließen sich ebenfalls keine Korrelationen zwischen den T-bet und IFN- γ Expressionen zeigen.

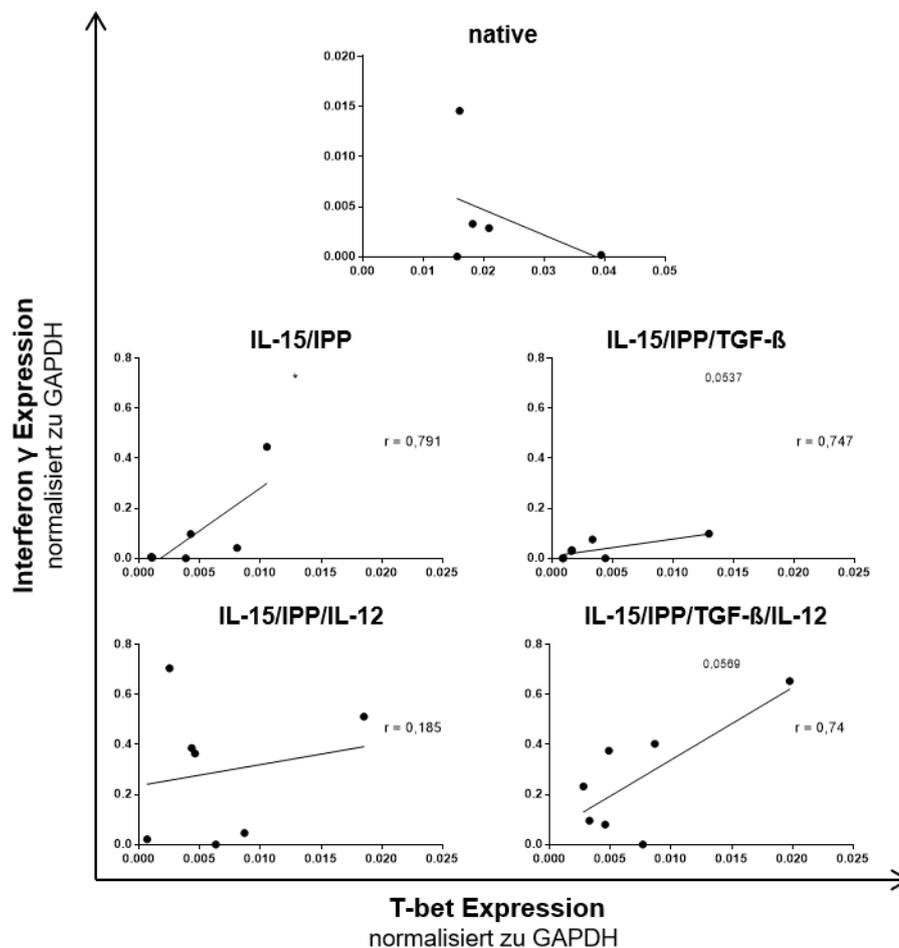


Abb. 22: Korrelation von der IFN- γ und T-bet Expression (normalisiert zu GAPDH) in nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen; „*“ für $p < 0,05$

3.5.2.2 T-bet mRNA Expression korreliert nicht mit dem Anteil Gimap4+ V γ 9V δ 2 T-Zellen

Da T-bet als Transkriptionsfaktor und die RasGTPase Gimap4 eine wichtige Rolle in der IL-12 induzierten IFN- γ Expression spielen, untersuchten wir die Frage, ob dann folglich die Gimap4 Expression mit der T-bet Expression korreliert. Die Gimap4 Expression wurde mittels FACS Analyse bestimmt, die mRNA Expression von T-bet via qPCR.

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen bzw. Zusammenhänge zwischen dem Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors T-bet und der Proteinexpression von Gimap4 in V γ 9V δ 2 T-Zellen.

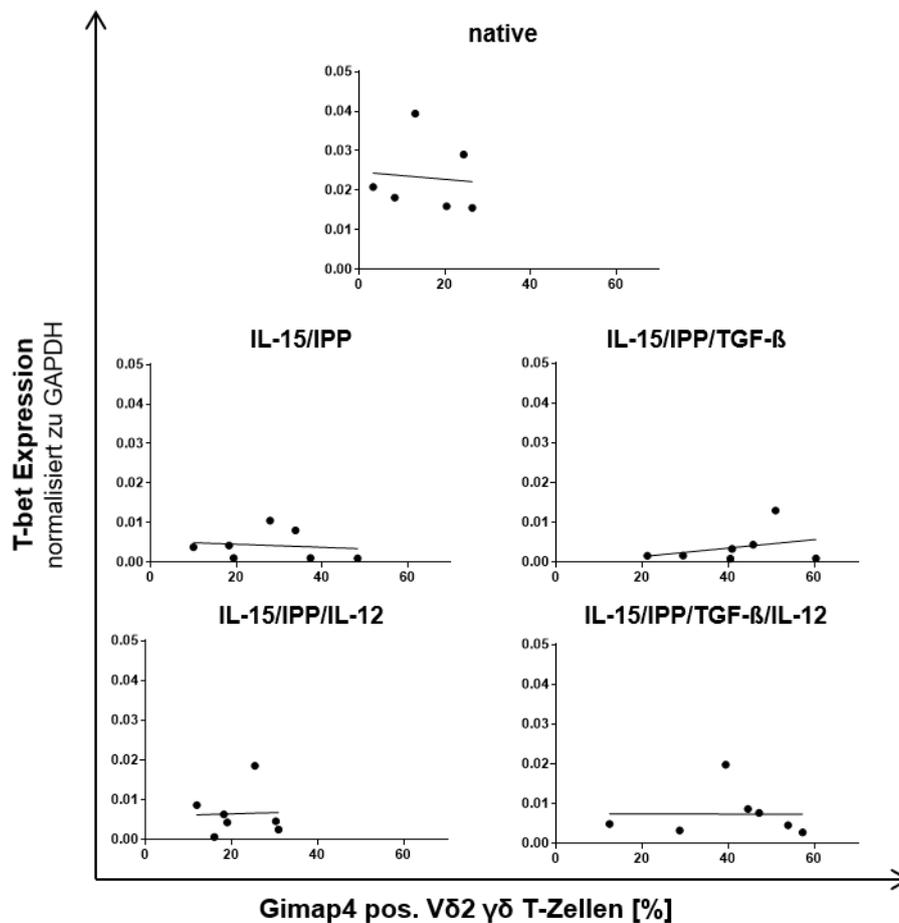


Abb. 23: Korrelation von der T-bet Expression (normalisiert zu GAPDH) und dem Anteil Gimap4⁺ Vδ2 T-Zellen in nativen und verschiedenartig stimulierten Vδ2 T-Zellen

3.5.3 Eomesodermin mRNA Expression

Wie T-bet gehört Eomesodermin (Eomes) zu der T-box Transkriptionsfamilie und ist ebenso in der Lage die IFN- γ Expression zu regulieren. Neben der T-bet Expression bestimmten wir daher mittels qPCR die Expressionsniveaus von Eomes in frisch isolierten und über ihren TZR in Anwesenheit verschiedener Zytokinkombinationen stimulierter V γ 9V δ 2 T-Zellen.

In Bezug auf die Eomes Expression konnten keine signifikanten Unterschiede vor und nach bzw. innerhalb der untersuchten Stimulationskombinationen festgestellt werden. Die Expressionsniveaus zwischen den Stimulationskombinationen sind einheitlicher als die der T-bet mRNA Expressionen. Die Eomes Expression scheint bei unstimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen höher als nach der Stimulation zu sein. Diese Beobachtung beruht jedoch auf dem Vergleich der Mittelwerte und ist nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich zwar ein Unterschied zur T-bet Expression detektieren, jedoch zeigten in unseren Versuchen weder der IPP vermittelte TZR Stimulus noch die Anwesenheit von IL-12 bzw. TGF- β einen signifikanten Einfluss auf die Eomes Expression der stimulierten V γ 9V δ 2 T-Zellen.

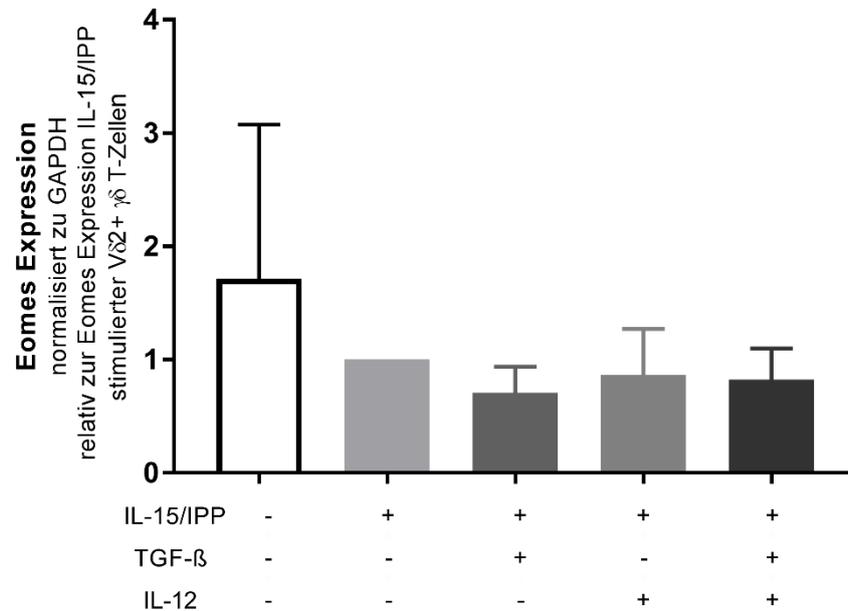


Abb. 24: Eomes Expression in nativen (-) und stimulierten (+) V δ 2 T-Zellpopulationen normalisiert zu GAPDH relativ zur Expression IL-15/IPP stimulierter V δ 2 T-Zellen; Signifikanztestung: abhängiger t-Test

3.5.4 Korrelationen zwischen der Eomes Expression und der T-bet Expression bzw. dem Anteil Gimap4+ V γ 9V δ 2 T-Zellen

3.5.4.1 Eomes mRNA Expression korreliert mit der T-bet mRNA Expression

Die beiden homologen Transkriptionsfaktoren Eomes und T-bet werden abhängig voneinander exprimiert. Um zu überprüfen, wie die beiden Transkriptionsfaktoren in unserem Versuchsaufbau untereinander reguliert werden, korrelierten wir die in der qPCR ermittelten, auf GAPDH normalisierten mRNA Expressionsniveaus.

In IL-15/IPP und IL-15/IPP/TGF- β stimulierten Gruppen korrelierte die mRNA Expression von Eomes und T-bet mit $r= 0,998$ und $0,891$. Die Ergebnisse eines Probanden wurden aufgrund nicht nachvollziehbar erhöhter Werte ausgeschlossen.

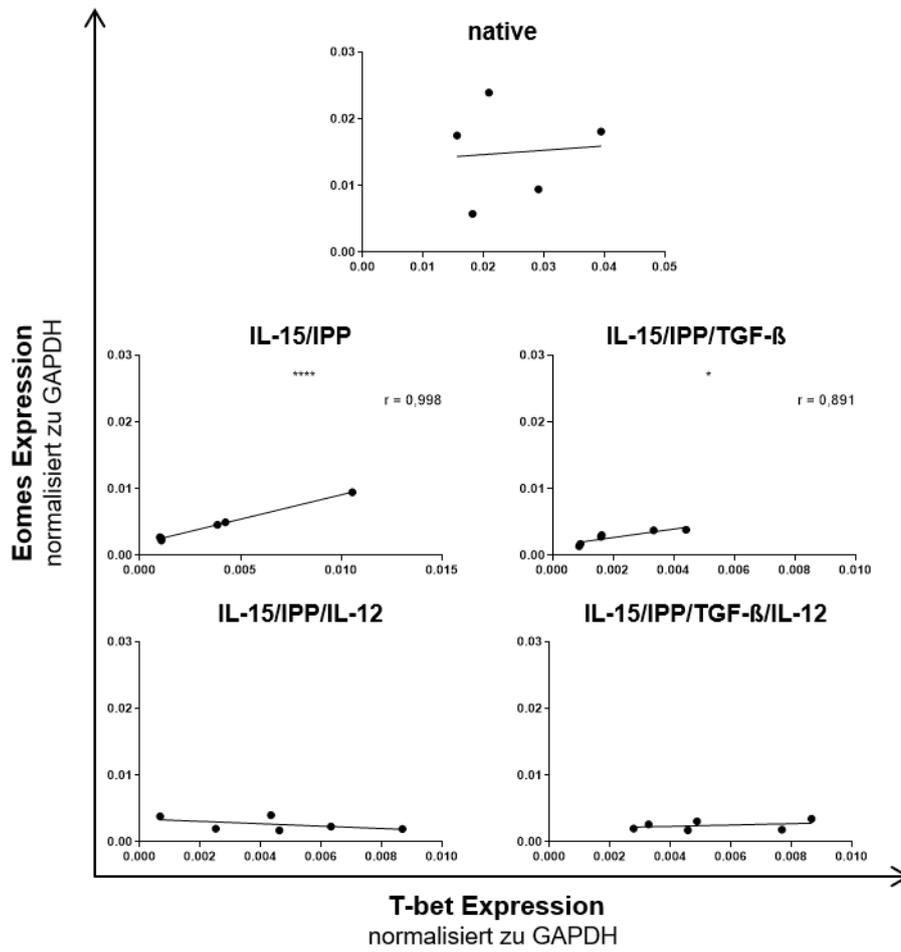


Abb. 25: Korrelation zwischen der Eomes und der T-bet Expression (normalisiert zu GAPDH); Korrelation mit „*“ für $p < 0,05$ bzw. „****“ für $p < 0,0001$

3.5.4.2 Eomes mRNA Expression korreliert nicht mit dem Anteil Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen

In der Literatur gibt es derzeit keine Hinweise auf einen potenziellen Zusammenhang zwischen Eomes und Gimap4 Expression in T-Zellen. Die mRNA Expression von Eomes wurde via qPCR ermittelt und auf GAPDH normalisiert, der Anteil an Gimap4⁺ V γ 9V δ 2 T-Zellen wurde mittels FACS Analyse bestimmt. Für die untersuchten V γ 9V δ 2 T-Zellkulturen zeigten sich in der Korrelationsanalyse der Expressionsniveaus von Eomes und Gimap4 keine Zusammenhänge.

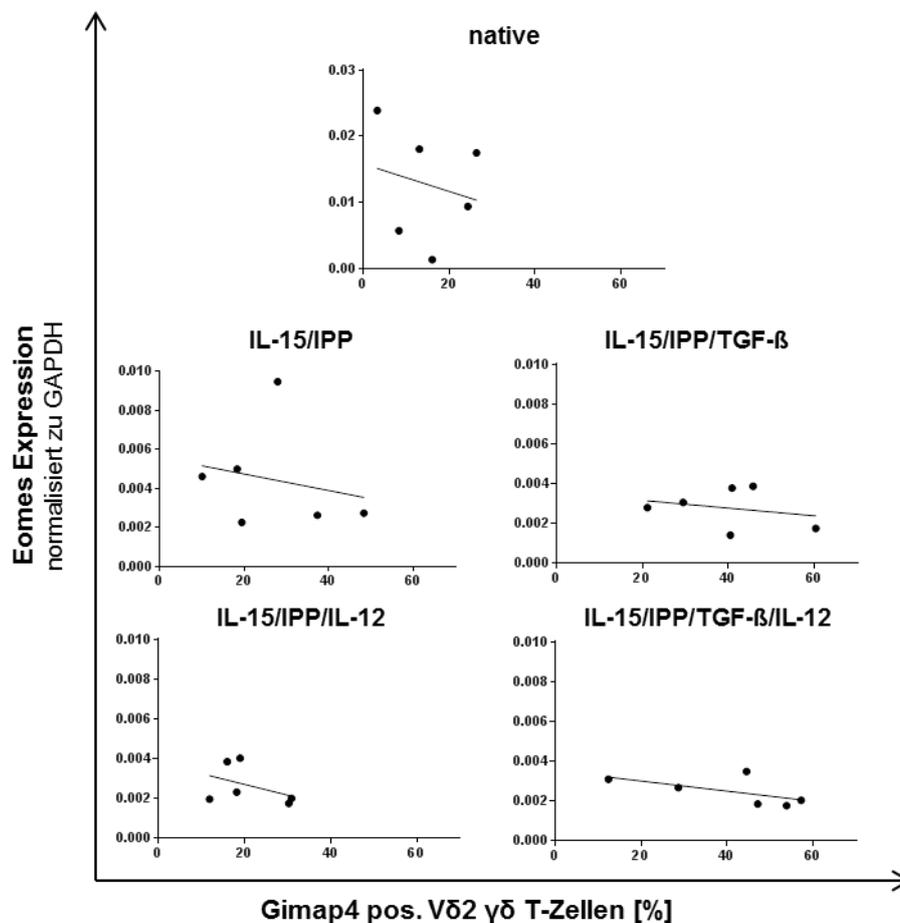


Abb. 26: Korrelation zwischen der Eomes Expression (normalisiert zu GAPDH) und dem Anteil Gimap4⁺ V δ 2 T-Zellen in nativen und verschiedenartig stimulierten V δ 2 T-Zellen

4 Diskussion

Im Immunsystem nehmen $\gamma\delta$ T-Zellen mit Eigenschaften, die der angeborenen und der adaptiven Immunantwort zuzuordnen sind, eine Brückenfunktion zwischen beiden Immunantworten ein.¹²⁶ $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen multiple Funktionen im Immunsystem und können neben Phagozytose und Antigenpräsentation die Entwicklung einer T-Zellantwort der adaptiven Immunität fördern oder unterdrücken bzw. in die Th1 oder Th2 Richtung beeinflussen. Sie spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Beendigung einer Immunantwort.^{127,128} Wir und viele andere Arbeitsgruppen konnten bereits *in vitro* und *in vivo* Modellen zeigen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen unterschiedliche Tumorentitäten erkennen und abtöten können.⁸⁵ Klinische Anwendungen von $\gamma\delta$ T-Zelltherapien zeigten bei hoher Sicherheit nicht die erhofften Ergebnisse in Bezug auf Survival und nachhaltiger Tumorreduktion.

Generell geht von $\gamma\delta$ T-Zellen eine Immunregulation des Immunsystems aus, worüber auf molekularer Ebene erst wenig bekannt ist. Für die klinische Anwendung von $\gamma\delta$ T-Zelltherapien ist das Wissen von Wirkmechanismen von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Interaktion mit $\alpha\beta$ T-Zellen allerdings wichtig, da immunregulatorische Effekte von $\gamma\delta$ Treg-Zellen für die bisher enttäuschenden Ergebnisse der klinischen Anwendung ursächlich sein könnten.^{94,96} In diesem Kontext soll diese Arbeit daher zum besseren Verständnis immunregulatorischer Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss über ihren TZR (in der Anwesenheit von Zytokinkombinationen) stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Apoptose- und Proliferationsraten von aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen haben. Analog zu Casetti et al. wurden die Wirkungen des Zytokins TGF- β sowie die des Th1 Zytokins IL-12 in Kombination mit IL-15/IPP auf die Induktion von $\gamma\delta$ Treg-Zellen untersucht.⁸⁴ Die wichtigste Versuchskomponente war jedoch die von Casetti et al. unterlassene Kontrollgruppe: die alleinige Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit IPP und IL-15.

In den Versuchen wurden über 10 Tage $\gamma\delta$ T-Zellen in PBMCs mit verschiedenen Zytokinkombinationen in Anwesenheit von IL-2 angereichert: IL-15/IPP/TGF- β (analog zu Casetti et al.), IL-15/IPP, IL-15/IPP/IL-12 sowie einer TZR Stimulation in Triple Zytokinkombination: IL-15/IPP/IL-12/TGF- β . Dabei zeigte sich wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, dass TGF- β einen leicht negativ, IL-12 einen

stärker negativen Einfluss (verglichen zur IL-2/IL-15/IPP Stimulation) auf den prozentualen Anteil erzeugter $\gamma\delta$ T-Zellen hat.³⁹ Anschließend wurden die angereicherten $\gamma\delta$ T-Zellen über ihren TZR mittels MicroBeads positiv isoliert und mit aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen im Effektor-/ Zielzellen-Verhältnis von 1:1 inkubiert (MLC). Nach 20h bzw. 72h wurden die Apoptose- bzw. Proliferationsraten der $\alpha\beta$ T-Zellen mittels eines AnnexinV bzw. CFSE Assay ermittelt. Wir folgten dabei der von Casetti et al. beschriebenen Versuchsanordnung. Als Zielzellen wurden für MLCs CD3/CD28-stimulierte autologe PBMCs verwendet.

Casetti et al. beschrieben ein immunsuppressives Potenzial von IL-15/IPP/TGF- β stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen, die FoxP3⁺ sind.⁸⁴ Von einem immunsuppressiven Potenzial kann ausgegangen werden, wenn eine Effektorpopulation ($\gamma\delta$ Treg-Zellen) die Proliferation der Zielpopulation (in autologen PBMCs enthaltene $\alpha\beta$ T-Zellen) um 50 % supprimiert. $\gamma\delta$ T-Zellen mit supprimierenden Eigenschaften werden als $\gamma\delta$ Treg-Zellen bezeichnet.⁷⁸ Analog zu Casetti et al. konnten wir mittels IL-15/IPP/TGF- β Stimulation $\gamma\delta$ Treg-Zellen erzeugen, die die Proliferation der aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen um durchschnittlich 70,33 % ($p=0,051$) supprimierte. IL-15/IPP stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen supprimierten die Proliferation von den untersuchten Gruppen jedoch am stärksten: durchschnittlich hemmten IL-15/IPP stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen die Proliferation der autologen $\alpha\beta$ T-Zellen um 83,75 %. (Bei 1/7 Probanden konnten durch die Stimulation mit IL-15/IPP keine $\gamma\delta$ Treg-Zellen erzeugt werden (Suppressionleistung <50 %)). Die Suppressionsleistung der IL-15/IPP stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ist nicht geringer, als die von Casetti et al. vorgeschlagene Stimulation mit IL-15/IPP und TGF- β . Schlussfolgernd ist damit die Anwesenheit des antiinflammatorischen Zytokin TGF- β bei der Induktion von $\gamma\delta$ Treg-Zellen nicht wie von Casetti et al. beschrieben, notwendig. Interessanterweise stimuliert die Kombination aus IL-15/TGF- β eine T_H1 typische Zytokinproduktion von IFN- γ und TNF- α in $\gamma\delta$ T-Zellen, welche einer suppressiven Funktion sogar entgegen stehen könnte.³⁹ Unsere Beobachtungen lassen daher vermuten, dass alleinig der IPP vermittelte TZR Stimulus die immunsuppressive Wirkung von $\gamma\delta$ T-Zellen hervorruft. In diesem Kontext sollte als nächster Schritt das mögliche immunsuppressive Potenzial vom Antikörper-vermittelten TZR Stimulus, der bei der (positiv) Isolation der $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgte, untersucht werden. Von besonderem Interesse wäre dabei die Quantifizierung des zusätzlichen immunsuppressiven Effekts, der vom Antikörper-

vermittelten TZR Stimulus ausgeht (aufbauend auf dem Protokoll von Traxlmayr et al.).⁷⁴ So ist die überraschend hohe Suppressionsleistung (durchschnittlich 58,41 %) von nativen positiv isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen möglicherweise ausschließlich dem bei der Isolierung erfolgten Antikörper-vermittelten TZR Stimulus zuzuschreiben. Traxlmayr et al. berichten, dass nicht aktivierte, negativ isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen kein suppressives Potenzial (hier Zielzellen: aktivierte CD4⁺ T-Zellen) besitzen.

Weiterhin sollten die Effekte der Zytokine IL-2 und IL-15, die beide bei der Stimulation mit IPP anwesend waren, einzeln voneinander auf die suppressiven Eigenschaften von $\gamma\delta$ Treg-Zellen untersucht werden. Fortführende Versuche bzgl. der immunsuppressiven Wirkung von lediglich IPP stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen wären daher ein nächster logischer Schritt.

Als Mechanismus für die beobachtete Suppression vermuteten wir initial den Transfer der Ras GTPase Gimap4 von $\gamma\delta$ Treg-Zellen auf die Zielzellen. Das suppressive Potenzial von IL-15/IPP/IL-12 bzw. IL-15/IPP/TGF- β stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen korrelierte mit der Gimap4 Expression. Allerdings können IL-15/IPP/IL-12 stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen, welche hohe Gimap4 Expressionen zeigten, aufgrund ihrer geringen Suppressivität (<50 %) nicht als $\gamma\delta$ Treg-Zellen gelten. Weiterhin wiesen die am stärksten suppressiven $\gamma\delta$ T-Zellpopulation (IL-15/IPP stimuliert) keine Korrelation zwischen der Gimap4 Expression und der Suppressionsleistung auf. Ob und welche Bedeutung daher ein möglicher Transfer von Gimap4 für das suppressive Potenzial von $\gamma\delta$ Treg-Zellen einnimmt, ist daher anhand unserer Beobachtungen nicht zu klären.

Darüber hinaus verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass die über TGF- β induzierte Expression des Transkriptionsfaktor FoxP3, der als Marker für regulatorische $\alpha\beta$ CD4⁺ Thymus-abstammende nTreg-Zellen gilt, nicht die immunsuppressive Wirkung der $\gamma\delta$ Treg-Zellen vermittelt. Entgegen Casetti et al. konnten weder Peters et al. noch wir eine Korrelation zwischen der FoxP3 Expressionen und dem suppressiven Potenzial der $\gamma\delta$ Treg-Zellen beobachten.³⁹ Dass FoxP3 als Suppressionsmarker ausgeschlossen werden kann, zeigt die Tatsache, dass die Stimulationsgruppe (IL-15/IPP stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen) mit der höchsten Suppressionsleistung die geringste FoxP3 Expression aller untersuchten Stimulationsgruppen aufwies. Mit unserer Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass FoxP3 nicht als Marker für suppressives Verhalten von $\gamma\delta$ Treg-Zellen gelten darf. Die Expression von FoxP3 kann eher als

Aktivierungsmarker analog der transienten Expression von FoxP3 bei aktivierten T-Helferzellen des $\alpha\beta$ T-Zellkompartments angesehen werden.

Als mögliche suppressive Mechanismen wurden von $\alpha\beta$ Treg-Zellen bekannte Mechanismen in $\gamma\delta$ Treg-Zellen identifiziert: Die bereits für $\alpha\beta$ Treg-Zellen bekannten suppressive Wirkmechanismen der inhibitorischen Rezeptoren PD-L1 und CTLA-4 beschrieben Peters et al. erstmals auch für die von $\gamma\delta$ Treg-Zellen ausgehende Immunregulation.^{73,129} In bisher unveröffentlichten Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir ebenfalls erhöhte Proteinexpressionen von PD-L1 bei $\gamma\delta$ Treg-Zellen, die allein über den TZR stimuliert worden waren, finden. Ein PD-L1 und CTLA-4 vermittelter Mechanismus steht weiterhin im Einklang zu der Beobachtung, dass die von $\gamma\delta$ Treg-Zellen ausgehende Immunregulation zellzahl- und zellkontaktabhängig ist.^{74,84}

Casetti et al. beschrieben eine positive Wirkung von TGF- β auf die FoxP3 Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen (untersucht auf Proteinebene mittels FACS). Auf der mRNA Ebene konnten wir die positive Wirkung von TGF- β auf die FoxP3 Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls zeigen. In Bezug auf das Zytokin IL-12 zeigten Zhao et al., dass die Anwesenheit von IL-12 während einer anti-CD3 Stimulation von $\alpha\beta$ Treg-Zellen deren FoxP3 Expression senkt (untersucht auf Proteinebene mittels FACS).¹¹¹ Bei Anwesenheit von IL-12 während einer TZR vermittelten Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen beobachteten wir dagegen eine IL-12 vermittelte gesteigerte FoxP3 Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen (mittels PCR bestimmte mRNA Expression). Den negativen Einfluss von IL-12 auf die FoxP3 Expression von $\alpha\beta$ Treg-Zellen konnten Zhao et al. durch die zusätzliche Anwesenheit von IL-2 wieder aufheben. Ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen von Zhao et al. und der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Zellpopulationen ($\alpha\beta$ Treg-Zellen vs. $\gamma\delta$ T-Zellen), der unterschiedlich angewandten Stimulations- (anti-CD3 vs. IPP) und Untersuchungsarten (FACS vs. PCR) jedoch nicht möglich.^{104,130} Weitere Untersuchungen der Methylierungsmuster des FoxP3 Gens von IPP/IL-12 stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen könnten aufklären, ob FoxP3 in $\gamma\delta$ T-Zellen in An- bzw. Abwesenheit einer TZR Stimulation \pm IL-12 konstitutiv oder transient exprimiert wird. Ebenfalls konnten wir beobachten, dass die Anwesenheit von IL-12 während einer IL-15/IPP vermittelten Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant deren IFN- γ mRNA Expression steigert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Daten die zeigen, dass

IL-12 (über den STAT4 Signalweg) die IFN- γ Produktion steigert, wenn angereicherte $\gamma\delta$ T-Zellen mit IL-12 stimuliert werden.^{131,132} In unserem Versuchsansatz zeigten IL-15/IPP/IL-12 und IL-15/IPP/IL-12/TGF- β stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen ähnlich hohe Expressionsniveaus des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ . Die hohe IFN- γ Expression der IL-15/IPP/IL-12 bzw. IL-15/IPP/IL-12/TGF- β stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen spricht für eine starke TH1 Aktivierung.¹³³ Konträr zu unserer Beobachtung, dass die Anwesenheit des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β nicht die mRNA Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ antagonisiert, beschrieben Bright et al. eine TGF- β dosisabhängige Reduktion der IL-12 induzierten IFN- γ Produktion (mittels ELISA an CD4⁺ T-Zellklonen gezeigt).¹³⁴ Als Wirkungskette der TGF- β Antagonisierung der IL-12 induzierten IFN- γ Expression wäre ein TGF- β vermittelter geringerer Phosphorylierungsgrad von STAT3 und 4 (über die von TGF- β induzierte Blockade der Tyrosinkinasen Jak-2 and Tyk-2) denkbar.¹³⁴

Weiterhin beobachteten wir, dass mit IL-15/IPP/IL-12 stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen die Proliferation von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen signifikant geringer supprimieren als IL-15/IPP stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen. Aufgrund der geringen Suppressionsleistung (<50%) können IL-15/IPP/IL-12 stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen nicht als $\gamma\delta$ Treg-Zellen gelten. Interessanterweise beobachteten auch Zhao et al. einen IL-12 vermittelten hemmenden Effekt auf die Induktion von $\alpha\beta$ Treg-Zellen.¹¹¹

IL-12 reguliert neben anderen T_H1 typischen Zytokinen über den STAT4 Signalweg die Gene der Ras GTPase Gimap4 hoch.¹¹⁶ Auch wenn IL-15/IPP/IL-12 stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen keine höheren Gimap4 Expressionen als frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen auf Proteinebene aufwiesen, konnte eine signifikante Korrelation ($r=0,827$) zwischen der IL-12 induzierten IFN- γ und der Gimap4 Expression beobachtet werden. Diese Beobachtung fügt sich in die aktuelle Auffassung ein, dass Gimap4 wie IFN- γ , STAT4 vermittelt durch IL-12 hochreguliert werden kann.¹¹⁵ Da die Gimap4 mRNA Expression aufgrund einer starken postranskriptionellen Regulierung einen geringen Aussagewert über die Proteinexpression hat, sahen wir die Notwendigkeit einer Bestimmung des intrazellulären Gimap4 Gehalts mittels FACS, welche in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurde.

Der Transkriptionsfaktor T-bet, als potenter Induktor von IFN- γ wird TZR abhängig durch IL-12 über den IFN- γ /STAT1 Signalweg in CD4⁺ T-Zellen hochreguliert.¹³⁵ Eine davon abgeleitete positive Korrelation zwischen der IFN- γ und T-bet Expression

konnten wir jedoch nicht beobachten. Da die T-bet Expression einer anderen Kinetik (hohe Expression an Tag 1 nach TZR Stimulation mit starker folgender Abnahme) als die der IFN- γ Expression (hohe Expression an Tag 1 nach TZR Stimulation mit konstanten Niveau, gezeigt bis Tag 7 nach TZR Stimulation) unterliegt, ist eine Korrelation zwischen der IFN- γ und T-bet mRNA Expression an Tag 10 der Stimulation eher unwahrscheinlich.¹³⁵ Die Korrelationen der T-bet und IFN- γ Expression von am Tag 1 extrahierter mRNA könnte darüber Aufschluss geben. Tatsächlich beobachteten wir in frisch über ihren TZR isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen tendenziell die höchste Expression von T-bet und dessen abhängig exprimierten Transkriptionsfaktor Eomes. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede in der ermittelten T-bet und Eomes Expression von an Tag 0 und Tag 10 extrahierter mRNA beobachten. Die Beobachtung von Ichyama et al., die eine supprimierende Wirkung von TGF- β auf die Eomes Expression zeigten, konnten wir nicht bestätigen.¹³⁶ Neben dem immunsuppressiven Potenzial beobachteten wir ein Apoptose-induzierendes Verhalten von TZR aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber autologen CD3/28 aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen. Die Apoptoseraten der $\alpha\beta$ T-Zellen von durchschnittlich 8,9 % (kokultiviert mit IL-15/IPP induzierten $\gamma\delta$ Treg-Zellpopulationen) fallen zwar gering aus; diese sind aber in einem physiologischen Kontext realistisch. Nicht stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten dagegen keine Apoptose-induzierenden Effekte, selbst wenn diese vor der MLC positiv über ihren TZR isoliert wurden. Dieser Befund verdeutlicht die Immuntoleranz der $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Apoptose vermittelnde Wirkung scheint von der TZR vermittelten Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen abhängig zu sein.

In der Literatur werden Gimap4 sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte zugesprochen.¹³⁷ In Bezug auf T-Zellen wurde gezeigt, dass Gimap4 bei Anwesenheit von Apoptosereizen beschleunigend auf den Apoptoseprozess wirkt. Gimap4 wird daher eine Mediatorrolle in der Ausführungsphase der Apoptose von T-Zellen zugesprochen.¹²¹ Dass die Anwesenheit von Gimap4 in T-Zellen Apoptose induziert, wurde bislang nicht beschrieben.

Zwischen der Gimap4 Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen und den Apoptoseraten von kokultivierten alloreaktiven $\alpha\beta$ T-Zellen beobachteten wir keinen Zusammenhang. Da IL-15/IPP/TGF- β stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen die höchste Gimap4 Expression zeigten, kann die Ras GTPase Gimap4 nicht als Apoptosemarker in dieser Zellentität gelten, sondern eher als Aktivierungsmarker nach IL-15/IPP/TGF- β Stimulation.

Über zytotoxische $\gamma\delta$ T-Zellen ist bekannt, dass sie TRAIL, FasL und Perforin/Granzyme B exprimieren.⁵⁴ Weiterführend untersuchten wir daher als möglichen Mechanismus der von $\gamma\delta$ T-Zellen ausgehenden Apoptoseinduktion die Expression der Apoptose-induzierenden Proteine Perforin/Granzyme B. Für klassische $\alpha\beta$ Treg Zellen wurde bereits eine solche Zytotoxizität beschrieben.⁷² Wir beobachteten jedoch bei über ihren TZR mit IPP stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen keine signifikant erhöhten Perforin/Granzyme B Transkriptionsraten und keine Korrelation zwischen den mRNA Expressionen und der beobachteten Apoptoseinduktion. Qin et al. fanden bei nativen negativ isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen mittlere Expressionsniveaus von NKG2D, Fas, TRAIL, Perforin und Granzyme B. Lediglich das Expressionsniveau von NKG2D und Perforin stieg durch die 14-tägige IPP Stimulation an.¹³⁸ Bei unseren Untersuchungen der Expressionsniveaus von Perforin und Granzyme B (Tag 0 vs. Tag 10 der Stimulation) von positiv isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten die nativen $\gamma\delta$ T-Zellen die höchsten Expressionsraten von Perforin und Granzyme B. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse gestaltet sich aufgrund der von uns angewendeten positiven Isolation mittels $\gamma\delta$ TZR Antikörper sowie der zusätzlichen Anwesenheit von IL-15 bei der Stimulation jedoch als schwierig. Höhere Expressionsniveaus von Perforin und Granzyme B in nativ isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen sind aufgrund einer möglichen, bereits vor der Vollblutentnahme erfolgten Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen in vivo, denkbar. Zusammenfassend kann Perforin und Granzyme B dennoch nicht vollumfänglich das beobachtete apoptotische Potenzial der $\gamma\delta$ T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen erklären. Weitere Analysen stimulierter $\gamma\delta$ T-Zellen auf NKG2D, Fas und TRAIL (Effektormoleküle der NK-Zellen) in Verbindung mit Zytotoxizitätsassays mit inkubierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen könnten den Mechanismus der von stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ausgehenden Zytotoxizität auf Rezeptorebene besser aufklären.

In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass über einen alleinigen TZR Stimulus immunsuppressive $\gamma\delta$ Treg-Zellen induziert werden, die neben einer FoxP3 unabhängigen Immunsuppression zusätzlich etwa 9 % Apoptose (s. Abb. 7) in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T Zellen verursachen. Dieses Wissen könnte die Entwicklung von Strategien unterstützen, die helfen, entweder autoimmune oder transplantationsbedingte Phänomene zu therapieren oder die Potenz von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Onko-Immunologie zu steigern.

5 Zusammenfassung

Die immunregulatorischen Wirkungen von $\gamma\delta$ Treg-Zellen sind in ihrer Komplexität erst wenig verstanden. Für klinische Anwendungen in Form von T-Zelltherapien ist dieses Wissen jedoch wichtig.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von über den TZR stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen näher untersucht. Bei über 10 Tage mit IL-2/IL-15/IPP sowie IL-2/IL-15/IPP/TGF- β stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen konnten wir ein starkes immunsuppressives Potenzial gegenüber aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen beobachten (Erzeugung von $\gamma\delta$ Treg-Zellen). Die Erzeugung von $\gamma\delta$ Treg-Zellen durch die Stimulationskombination IL-2/IL-15/IPP lässt vermuten, dass nicht wie von Casetti et al. beschrieben die Stimulation mit IL-15/IPP/TGF- β , sondern alleinig der TZR Stimulus mit IL-15 essenziell für die Induktion von $\gamma\delta$ Treg-Zellen ist.⁸⁴ Bei zusätzlicher Anwesenheit von IL-12 wurden dagegen keine $\gamma\delta$ Treg-Zellen generiert. Die Beobachtung von Peters et al., dass es keinen Zusammenhang zwischen der von $\gamma\delta$ Treg-Zellen ausgehenden Immunsuppression und der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 gibt, konnten wir bestätigen.³⁹ Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass FoxP3 als Aktivierungsmarker analog der Expression von FoxP3 bei aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird. Darüber hinaus beobachteten wir einen Apoptose-induzierenden Effekt von IL-2/IL-15/IPP sowie IL-2/IL-15/IPP/IL-12 stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen auf aktivierte autologe $\alpha\beta$ T-Zellen. Dieser war mit ca. 9 % Apoptoserate schwach ausgeprägt, er verdeutlicht aber die feinjustierende Rolle der $\gamma\delta$ Treg-Zellen in der Regulation der Immunantworten. Als Apoptose-induzierende Mechanismen untersuchten wir die Expressionen der Ras GTPase Gimap4 und der zytolytischen Proteine Perforin/Granzyme B. Deren mRNA Expressionen korrelierten jedoch nicht mit den beobachteten Apoptoseraten von aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen und können die Apoptose-induzierende Wirkung von über ihren TZR stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen nicht erklären.

Die Ergebnisse der Arbeit weisen damit erstmals darauf hin, dass allein über eine Stimulation mit IL-2/IL-15/IPP $\gamma\delta$ Treg-Zellen generiert werden können, die neben einem starken, FoxP3 unabhängigen immunsuppressiven Potenzial auch Apoptose in aktivierten autologen $\alpha\beta$ T-Zellen induzieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Kaufmann, S. H. E. Basiswissen Immunologie (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014).
2. Herold, G. Innere Medizin 2019. Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis (Herold Gerd, Köln, 2018).
3. Pezzutto, A., Ulrichs, T. & Burmester, G.-R. Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, New York, 2007).
4. Pozzese, N. et al. Role of caspase-8 in thymus function. *Cell death and differentiation* 21, 226–233; 10.1038/cdd.2013.166 (2014).
5. Wieczorek, M. et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins. Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology* 8, 290; 10.3389/fimmu.2017.00292 (2017).
6. Adams, E. J., Gu, S. & Luoma, A. M. Human gamma delta T cells. Evolution and ligand recognition. *Cellular immunology* 296, 31–40; 10.1016/j.cellimm.2015.04.008 (2015).
7. Lepore, M., Mori, L. & Libero, G. de. The Conventional Nature of Non-MHC-Restricted T Cells. *Frontiers in immunology* 9, 1365; 10.3389/fimmu.2018.01365 (2018).
8. Engel, P. et al. CD Nomenclature 2015. Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 195, 4555–4563; 10.4049/jimmunol.1502033 (2015).
9. Parel, Y. & Chizzolini, C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity reviews* 3, 215–220; 10.1016/j.autrev.2003.09.001 (2004).
10. Garcillán, B. et al. $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the Diagnosis of Human T Cell Receptor Immunodeficiencies. *Frontiers in immunology* 6, 20; 10.3389/fimmu.2015.00020 (2015).
11. Cai, J.-L. & Tucker, P. W. in *Gamma-Delta T Cells*, edited by P.R. Bergstresser & A. Takashima (KARGER, Basel, 2001), pp. 99–138.
12. Köhl, A. A. et al. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology* 128, 580–588; 10.1111/j.1365-2567.2009.03162.x (2009).
13. Kenneth Murphy, C. W. *Janeway's Immunobiology*. 9th Edition (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, 2017).
14. Bergstresser, P.R. & Takashima, A. (eds.). *Gamma-Delta T Cells* (KARGER, Basel, 2001).
15. Granel, B. et al. Etude rétrospective de 55 patients présentant une lymphocytose T gamma/delta dans le sang circulant. *La Revue de medecine interne* 23, 137–143 (2002).
16. Kabelitz, D., Wesch, D. & Hinz, T. gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer seminars in immunopathology* 21, 55–75 (1999).

17. Carding, S. R. & Egan, P. J. Gammadelta T cells. Functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 2, 336–345; 10.1038/nri797 (2002).
18. Havran, W. L. & Allison, J. P. Origin of Thy-1+ dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors. *Nature* 344, 68–70; 10.1038/344068a0 (1990).
19. Ebert, L. M., Meuter, S. & Moser, B. Homing and Function of Human Skin T Cells and NK Cells. Relevance for Tumor Surveillance. *The Journal of Immunology* 176, 4331–4336; 10.4049/jimmunol.176.7.4331 (2006).
20. Kabelitz, D. & Dechanet-Merville, J. Recent advances in $\gamma\delta$ T cell biology. New ligands, new functions, and new translational perspectives (Frontiers Media SA, s.l., 2016).
21. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30, 16–34; 10.3109/08830185.2010.529976 (2011).
22. Holtmeier, W. & Kabelitz, D. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* 86, 151–183; 10.1159/000086659 (2005).
23. Born, W. K. et al. gammadelta T lymphocytes-selectable cells within the innate system? *Journal of Clinical Immunology* 27, 133–144; 10.1007/s10875-007-9077-z (2007).
24. Benveniste, P. M. et al. Generation and molecular recognition of melanoma-associated antigen-specific human $\gamma\delta$ T cells. *Science immunology* 3; 10.1126/sciimmunol.aav4036 (2018).
25. Miyawaki, T., Kasahara, Y., Taga, K., Yachie, A. & Taniguchi, N. Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR-gamma/delta+ lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 171, 1833–1838 (1990).
26. Scotet, E., Nedellec, S., Devilder, M.-C., Allain, S. & Bonneville, M. Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 6872–6885 (2008).
27. Lombes, A. et al. Adaptive Immune-like $\gamma\delta$ T Lymphocytes Share Many Common Features with Their α/β T Cell Counterparts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195, 1449–1458; 10.4049/jimmunol.1500375 (2015).
28. Wrobel, P. et al. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells. Involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scandinavian journal of immunology* 66, 320–328; 10.1111/j.1365-3083.2007.01963.x (2007).
29. Correia, D. V., Lopes, A. & Silva-Santos, B. Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes. T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology* 2, e22892; 10.4161/onci.22892 (2013).
30. Zingoni, A. et al. NKG2D and Its Ligands. "One for All, All for One". *Frontiers in immunology* 9, 476; 10.3389/fimmu.2018.00476 (2018).
31. Luoma, A. M., Castro, C. D. & Adams, E. J. $\gamma\delta$ T cell surveillance via CD1 molecules. *Trends in immunology* 35, 613–621; 10.1016/j.it.2014.09.003 (2014).

32. Begley, M. et al. The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gammadelta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS letters* 561, 99–104; 10.1016/S0014-5793(04)00131-0 (2004).
33. Espinosa, E. et al. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 18337–18344; 10.1074/jbc.M100495200 (2001).
34. Thompson, K. et al. in *Osteoimmunology*, edited by Y. Choi (Springer Science+Business Media LLC, Boston, MA, 2010), pp. 11–20.
35. Sebestyen, Z. et al. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V γ 9V δ 2 T Cell Receptor. *Cell reports* 15, 1973–1985; 10.1016/j.celrep.2016.04.081 (2016).
36. Harly, C., Peigné, C.-M. & Scotet, E. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Frontiers in immunology* 5, 657; 10.3389/fimmu.2014.00657 (2014).
37. van Acker, H. H. et al. Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells. *Journal of hematology & oncology* 9, 101; 10.1186/s13045-016-0329-3 (2016).
38. Lilienfeld-Toal, M. von et al. Coculture with dendritic cells promotes proliferation but not cytotoxic activity of gamma/delta T cells. *Immunology letters* 99, 103–108; 10.1016/j.imlet.2005.02.001 (2005).
39. Peters, C., Oberg, H.-H., Kabelitz, D. & Wesch, D. Phenotype and regulation of immunosuppressive V δ 2-expressing $\gamma\delta$ T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 1943–1960; 10.1007/s00018-013-1467-1 (2014).
40. Paul, S. & Lal, G. Regulatory and effector functions of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *International journal of cancer* 139, 976–985; 10.1002/ijc.30109 (2016).
41. Wang, L., Das, H., Kamath, A. & Bukowski, J. F. Human V 2V 2 T Cells Produce IFN- and TNF- with an On/Off/On Cycling Pattern in Response to Live Bacterial Products. *The Journal of Immunology* 167, 6195–6201; 10.4049/jimmunol.167.11.6195 (2001).
42. Gao, Y. et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* 198, 433–442; 10.1084/jem.20030584 (2003).
43. Vignali, D. A. A. & Kuchroo, V. K. IL-12 family cytokines. *Immunological playmakers. Nature immunology* 13, 722–728; 10.1038/ni.2366 (2012).
44. Tarique, M. et al. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3+ regulatory T cells in human Leprosy. *Molecular immunology* 83, 72–81; 10.1016/j.molimm.2017.01.008 (2017).
45. Oldenhove, G. et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31, 772–786; 10.1016/j.immuni.2009.10.001 (2009).
46. Zhou, J., Kang, N., Cui, L., Ba, D. & He, W. Anti- $\gamma\delta$ TCR antibody-expanded $\gamma\delta$ T cells. A better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies. *Cellular & molecular immunology* 9, 34–44; 10.1038/cmi.2011.16 (2012).
47. Lino, C. N. R., Barros-Martins, J., Oberdörfer, L., Walzer, T. & Prinz, I. Eomes expression reports the progressive differentiation of IFN- γ -producing Th1-like $\gamma\delta$

- T cells. *European journal of immunology* 47, 970–981; 10.1002/eji.201646753 (2017).
48. Bhat, S. A., Vedpathak, D. M. & Chiplunkar, S. V. Checkpoint Blockade Rescues the Repressive Effect of Histone Deacetylases Inhibitors on $\gamma\delta$ T Cell Function. *Frontiers in immunology* 9, 1615; 10.3389/fimmu.2018.01615 (2018).
49. Ribot, J. C., Ribeiro, S. T., Correia, D. V., Sousa, A. E. & Silva-Santos, B. Human $\gamma\delta$ thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192, 2237–2243; 10.4049/jimmunol.1303119 (2014).
50. Zou, C. et al. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Oncotarget* 8, 8900–8909; 10.18632/oncotarget.13051 (2017).
51. Schlaak, J. F., Hermann, E., Gallati, H., Zum Meyer Büschenfelde, K. H. & Fleischer, B. Differential effects of IL-10 on proliferation and cytokine production of human gamma/delta and alpha/beta T cells. *Scandinavian journal of immunology* 39, 209–215 (1994).
52. Mao, Y. et al. A new effect of IL-4 on human $\gamma\delta$ T cells. Promoting regulatory V δ 1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of V δ 2 T cells. *Cellular & molecular immunology* 13, 217–228; 10.1038/cmi.2015.07 (2016).
53. Rhodes, K. A., Andrew, E. M., Newton, D. J., Tramonti, D. & Carding, S. R. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *European journal of immunology* 38, 2274–2283; 10.1002/eji.200838354 (2008).
54. Kondo, M. et al. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 10, 842–856; 10.1080/14653240802419328 (2008).
55. Pont, F. et al. The gene expression profile of phosphoantigen-specific human $\gamma\delta$ T lymphocytes is a blend of $\alpha\beta$ T-cell and NK-cell signatures. *European journal of immunology* 42, 228–240; 10.1002/eji.201141870 (2012).
56. Maniar, A. et al. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* 116, 1726–1733; 10.1182/blood-2009-07-234211 (2010).
57. Schneiders, F. L. et al. CD1d-restricted antigen presentation by V γ 9V δ 2-T cells requires trogocytosis. *Cancer immunology research* 2, 732–740; 10.1158/2326-6066.CIR-13-0167 (2014).
58. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* 3, 51; 10.3389/fimmu.2012.00051 (2012).
59. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330–336; 10.1038/ni904 (2003).
60. Roncador, G. et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European journal of immunology* 35, 1681–1691; 10.1002/eji.200526189 (2005).
61. Morgan, M. E. et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Human immunology* 66, 13–20; 10.1016/j.humimm.2004.05.016 (2005).

62. Roncarolo, M. G. et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 212, 28–50; 10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x (2006).
63. Okamura, T., Fujio, K., Sumitomo, S. & Yamamoto, K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Annals of the rheumatic diseases* 71 Suppl 2, i96-100; 10.1136/annrheumdis-2011-200588 (2012).
64. Thornton, A. M. et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184, 3433–3441; 10.4049/jimmunol.0904028 (2010).
65. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 24, 99–146; 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737 (2006).
66. Taga, K. & Tosato, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148, 1143–1148 (1992).
67. Cauwels, A., Rogge, E., Vandendriessche, B., Shiva, S. & Brouckaert, P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis* 5, e1102-e1102; 10.1038/cddis.2014.70 (2017).
68. Borsellino, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells. Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225–1232; 10.1182/blood-2006-12-064527 (2007).
69. Klein, M. & Bopp, T. Cyclic AMP Represents a Crucial Component of Treg Cell-Mediated Immune Regulation. *Frontiers in immunology* 7, 315; 10.3389/fimmu.2016.00315 (2016).
70. Walker, L. S. K. Treg and CTLA-4. Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of autoimmunity* 45, 49–57; 10.1016/j.jaut.2013.06.006 (2013).
71. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* 188, 287–296 (1998).
72. Grossman, W. J. et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589–601; 10.1016/j.immuni.2004.09.002 (2004).
73. Peters, C., Kabelitz, D. & Wesch, D. Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75, 2125–2135; 10.1007/s00018-018-2788-x (2018).
74. Traxlmayr, M. W. et al. Immune suppression by gammadelta T-cells as a potential regulatory mechanism after cancer vaccination with IL-12 secreting dendritic cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 33, 40–52; 10.1097/CJI.0b013e3181b51447 (2010).
75. Hayday, A. & Tigelaar, R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nature reviews. Immunology* 3, 233–242; 10.1038/nri1030 (2003).
76. Karunakaran, M. M., Göbel, T. W., Starick, L., Walter, L. & Herrmann, T. V γ 9 and V δ 2 T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (BTN3) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (*Vicugna pacos*). *Immunogenetics* 66, 243–254; 10.1007/s00251-014-0763-8 (2014).

77. Patel, S. S., Wacholtz, M. C., Duby, A. D., Thiele, D. L. & Lipsky, P. E. Analysis of the functional capabilities of CD3+CD4-CD8- and CD3+CD4+CD8+ human T cell clones. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 143, 1108–1117 (1989).
78. Peng, G. et al. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 27, 334–348; 10.1016/j.immuni.2007.05.020 (2007).
79. Dai, J., Liu, B. & Li, Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors. What is the missing link? *International immunopharmacology* 9, 528–533; 10.1016/j.intimp.2009.01.027 (2009).
80. Ye, J. et al. Tumor-derived $\gamma\delta$ regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 190, 2403–2414; 10.4049/jimmunol.1202369 (2013).
81. Seo, N., Tokura, Y., Takigawa, M. & Egawa, K. Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 163, 242–249 (1999).
82. Hu, G. et al. Tumor-infiltrating CD39+ $\gamma\delta$ Tregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 6, e1277305; 10.1080/2162402X.2016.1277305 (2017).
83. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* 8, 1353–1362; 10.1038/ni1536 (2007).
84. Casetti, R. et al. Cutting edge. TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 183, 3574–3577; 10.4049/jimmunol.0901334 (2009).
85. Hoeres, T., Smetak, M., Pretscher, D. & Wilhelm, M. Improving the Efficiency of V γ 9V δ 2 T-Cell Immunotherapy in Cancer. *Frontiers in immunology* 9, 800; 10.3389/fimmu.2018.00800 (2018).
86. Fujii, K. New Therapies and Immunological Findings in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Frontiers in oncology* 8, 198; 10.3389/fonc.2018.00198 (2018).
87. Goto, S., Noguchi, A., Jinguji, H. & Takahara, M. The therapeutic potential of immuno-cell therapy of cancer in combination with aminobisphosphonates. *Anticancer research* 26, 3989–3995 (2006).
88. Gu, S., Nawrocka, W. & Adams, E. J. Sensing of Pyrophosphate Metabolites by V γ 9V δ 2 T Cells. *Frontiers in immunology* 5, 688; 10.3389/fimmu.2014.00688 (2014).
89. Pauza, C. D. et al. Gamma Delta T Cell Therapy for Cancer. It Is Good to be Local. *Frontiers in immunology* 9, 1305; 10.3389/fimmu.2018.01305 (2018).
90. Pineton de Chambrun, M., Wechsler, B., Geri, G., Cacoub, P. & Saadoun, D. New insights into the pathogenesis of Behçet's disease. *Autoimmunity reviews* 11, 687–698; 10.1016/j.autrev.2011.11.026 (2012).
91. van Acker, H. H. et al. The role of the common gamma-chain family cytokines in $\gamma\delta$ T cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews* 41, 54–64; 10.1016/j.cytogfr.2018.05.002 (2018).

92. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy. Moving beyond current vaccines. *Nature medicine* 10, 909–915; 10.1038/nm1100 (2004).
93. Wakita, D. et al. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *European journal of immunology* 40, 1927–1937; 10.1002/eji.200940157 (2010).
94. Mondragón, L., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Immunosuppressive $\gamma\delta$ T cells foster pancreatic carcinogenesis. *Oncoimmunology* 5, e1237328; 10.1080/2162402X.2016.1237328 (2016).
95. Zhao, Y., Niu, C. & Cui, J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells. Friend or foe in cancer development? *Journal of translational medicine* 16, 3; 10.1186/s12967-017-1378-2 (2018).
96. Silva-Santos, B., Serre, K. & Norell, H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nature reviews. Immunology* 15, 683–691; 10.1038/nri3904 (2015).
97. Hu, Y. et al. Reduction of Foxp3+ T cell subsets involved in incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematological oncology* 35, 118–124; 10.1002/hon.2255 (2017).
98. Maeda, Y. et al. Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 106, 749–755; 10.1182/blood-2004-10-4087 (2005).
99. Pabst, C., Schirutschke, H., Ehninger, G., Bornhäuser, M. & Platzbecker, U. The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2916–2922; 10.1158/1078-0432.CCR-06-2602 (2007).
100. Frances Mercer & Derya Unutmaz corresponding. The Biology of FoxP3: A Key Player in Immune Suppression during Infections, Autoimmune Diseases and Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 665: 47–59. *Adv Exp Med Biol.* 2009, 47–59.
101. Allan, S. E. et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology* 19, 345–354; 10.1093/intimm/dxm014 (2007).
102. Probst-Kepper, M. & Buer, J. FOXP3 and GARP (LRRC32). The master and its minion. *Biology direct* 5, 8; 10.1186/1745-6150-5-8 (2010).
103. Liping Sun, Hao Jin & and Hui Li. GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF- β releasing. *Oncotarget* (2016).
104. Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5138–5143; 10.1073/pnas.0501675102 (2005).
105. Zheng, Y. & Rudensky, A. Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature immunology* 8, 457–462; 10.1038/ni1455 (2007).
106. Kang, N. et al. Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunology letters* 125, 105–113; 10.1016/j.imlet.2009.06.005 (2009).

107. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF- β activation and function in immunity. Annual review of immunology 32, 51–82; 10.1146/annurev-immunol-032713-120257 (2014).
108. Tone, Y. et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. Nature immunology 9, 194–202; 10.1038/ni1549 (2008).
109. Chen, W. & Konkel, J. E. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. Journal of molecular cell biology 2, 30–36; 10.1093/jmcb/mjp004 (2010).
110. R.Walker, M. et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. J. Clin. Invest. 112, 1437–1443; 10.1172/JCI200319441 (2003).
111. Zhao, J., Zhao, J. & Perlman, S. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells. Roles of IFN- γ , IL-2 and IL-2R. PloS one 7, e46241; 10.1371/journal.pone.0046241 (2012).
112. Nicholson, D. W. et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 376, 37–43; 10.1038/376037a0 (1995).
113. Hardwick, J. M. & Soane, L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. Cold Spring Harbor perspectives in biology 5; 10.1101/cshperspect.a008722 (2013).
114. Reuber, T. L. & Ausubel, F. M. Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. The Plant cell 8, 241–249; 10.1105/tpc.8.2.241 (1996).
115. Heinonen, M. Annales Universitatis Turkuensis D 1183, 2015.
116. Heinonen, M. T. et al. GIMAP GTPase family genes. Potential modifiers in autoimmune diabetes, asthma, and allergy. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 194, 5885–5894; 10.4049/jimmunol.1500016 (2015).
117. Lee, Y. J. et al. Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behcet's disease. Annals of the rheumatic diseases 72, 1510–1516; 10.1136/annrheumdis-2011-200288 (2013).
118. Hellquist, A. et al. The human GIMAP5 gene has a common polyadenylation polymorphism increasing risk to systemic lupus erythematosus. Journal of medical genetics 44, 314–321; 10.1136/jmg.2006.046185 (2007).
119. Heinonen, M. T., Kanduri, K., Lähdesmäki, H. J., Lahesmaa, R. & Henttinen, T. A. Tubulin- and actin-associating GIMAP4 is required for IFN- γ secretion during Th cell differentiation. Immunology and cell biology 93, 158–166; 10.1038/icb.2014.86 (2015).
120. Schnell, S., Demolliere, C., van den Berk, P. & Jacobs, H. Gimap4 accelerates T-cell death. Blood 108, 591–599; 10.1182/blood-2005-11-4616 (2006).
121. Filen, S. & Lahesmaa, R. GIMAP Proteins in T-Lymphocytes. Journal of signal transduction 2010, 268589; 10.1155/2010/268589 (2010).
122. Nitta, T. et al. IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes. PLoS biology 4, e103; 10.1371/journal.pbio.0040103 (2006).
123. Filén, J.-J. et al. Quantitative proteomics reveals GIMAP family proteins 1 and 4 to be differentially regulated during human T helper cell differentiation. Molecular & cellular proteomics : MCP 8, 32–44; 10.1074/mcp.M800139-MCP200 (2009).
124. Ryan Duggan. My 3-step approach to gating Annexin V data appropriately. Available at <http://ucflow.blogspot.de/2012/07/my-3-step-approach-to-gating-annexin-v.html> (2012).

125. Takemoto, N., Intlekofer, A. M., Northrup, J. T., Wherry, E. J. & Reiner, S. L. Cutting Edge. IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177, 7515–7519 (2006).
126. Kabelitz, D. $\gamma\delta$ T-cells. Cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 2331–2333; 10.1007/s00018-011-0696-4 (2011).
127. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best. Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* 13, 88–100; 10.1038/nri3384 (2013).
128. Wesch, D., Peters, C. & Siegers, G. M. Human gamma delta T regulatory cells in cancer. Fact or fiction? *Frontiers in immunology* 5, 598; 10.3389/fimmu.2014.00598 (2014).
129. Kabelitz, D., Peters, C., Wesch, D. & Oberg, H.-H. Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells. *International immunopharmacology* 16, 382–387; 10.1016/j.intimp.2013.01.022 (2013).
130. Barbi, J., Pardoll, D. M. & Pan, F. Ubiquitin-dependent regulation of Foxp3 and Treg function. *Immunological reviews* 266, 27–45; 10.1111/imr.12312 (2015).
131. Skeen, M. J. & Ziegler, H. K. Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 154, 5832–5841 (1995).
132. Bacon, C. M. et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *European journal of immunology* 38, 2274–2283; 10.1073/pnas.92.16.7307 (2008).
133. van Acker, H. H., Anguille, S., van Tendeloo, V. F. & Lion, E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology* 4, e1021538; 10.1080/2162402X.2015.1021538 (2015).
134. Bright, J. J. & Sriram, S. TGF-beta inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 161, 1772–1777 (1998).
135. Ylikoski, E. et al. IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN-gamma in human CD4⁺ T cells. *European journal of immunology* 35, 3297–3306; 10.1002/eji.200526101 (2005).
136. Ichiyama, K. et al. Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor- β is mediated by suppression of eomesodermin. *Immunity* 34, 741–754; 10.1016/j.immuni.2011.02.021 (2011).
137. Ho, C.-H. & Tsai, S.-F. Functional and biochemical characterization of a T cell-associated anti-apoptotic protein, GIMAP6. *The Journal of biological chemistry* 292, 9305–9319; 10.1074/jbc.M116.768689 (2017).
138. Qin, G. et al. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *The Journal of infectious diseases* 200, 858–865; 10.1086/605413 (2009).

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Karin Schilbach durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Karin Schilbach, Arbeitsgruppenleiterin. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch MD Hisayoshi Hashimoto, Labormitglied von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Rücksprache mit MD Hisayoshi Hashimoto eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig unter Betreuung durch Prof Dr. Karin Schilbach verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 20.04.2020

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Schilbach, K., Krickeberg, N., Kaißer, C., Mingram, S., Kind, J., Siegers, G., Hashimoto, H., Suppressive activity of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells on $\alpha\beta$ T cells is licensed by TCR signaling and correlates with signal strength. *Cancer Immunol. Immunother.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02469-8>

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie die Durchsicht der Arbeit durch Frau Prof. Dr. Karin Schilbach ausdrücklich bedanken. MD Hisayoshi Hashimoto danke ich herzlich für die vielen anregenden Gespräche, seine besondere Unterstützung sowie Hilfe und Einführung in die wissenschaftliche Laborarbeit. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den freiwilligen Spendern für ihr Mitwirken an der Studie.

Mein Dank gilt den Korrekturlesern. Ein ganz großes Dankeschön gilt auch Katrin und Felix für ihre nicht zu ersetzende freundschaftliche Unterstützung.

Bei Alexandra und meiner Familie möchte ich mich herzlich bedanken, dass sie mich auf meinem Weg liebevoll unterstützt und gefördert haben.

Schließlich möchte ich mich beim Promotionskolleg des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Universität Tübingen für die finanzielle Förderung, die die vorliegende Arbeit ermöglichte, bedanken.