

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. H. Einsele

**Aktivierung und Zytotoxizität
von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gegenüber Tumorzellen
hämatologischen Ursprungs**

Untersuchungen in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Andreas Lindner

aus Zeil am Main

Würzburg
im Juni 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. V. Kunzmann
Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. T. Herrmann
Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt.

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet
meiner Mutter Maria Lindner
und Pfr. Karl Lang (+ 24. April 2003)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 $\gamma\delta$ T-LYMPHOZYTEN	2
1.2 AKTIVIERUNG VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN	3
1.3 EFFEKTORFUNKTIONEN VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN.....	7
1.4 STRATEGIEN DER IMMUNTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN MIT $\gamma\delta$ T-ZELLEN.....	10
2. ZIELE DER UNTERSUCHUNGEN	12
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 MEDIEN	13
3.2 ANTIKÖRPER.....	14
3.3 ZELLEN.....	15
3.4 ANREICHERUNG DER $\gamma\delta$ T-ZELLEN.....	15
3.5 KULTUR DER ZELLINIEN.....	16
3.6 ISOLIERUNG VON TUMORZELLEN AUS VENÖSEM VOLLBLUT	16
3.7 ISOLIERUNG VON TUMORZELLEN AUS LYMPHKNOTEN	17
3.8 MESSUNG DER AKTIVIERUNG VON $\gamma\delta$ T-LYMPHOZYTEN.....	17
3.9 BESTIMMUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON $\gamma\delta$ T-LYMPHOZYTEN.....	19
3.10 GERÄTE.....	22
4. ERGEBNISSE	23
4.1 PROLIFERATION UND AKTIVIERUNG VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN DURCH BRHHP	23
4.2 AKTIVIERUNG VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN DURCH TUMORZELLEN	25
4.2.1. <i>Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Tumorzelllinien</i>	25
4.2.2. <i>Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Patienten-Tumorzellen</i>	27
4.3 ANTI-TUMORAKTIVITÄT VON BRHPP-STIMULIERTEN $\gamma\delta$ T-ZELLEN	37
4.3.1. <i>Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Zelllinien</i>	38
4.3.2. <i>Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Patienten-Tumorzellen</i>	41
4.4 AKTIVIERUNG UND ZYTOTOXISCHES POTENTIAL VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN GEGENÜBER MIT ZOLEDRONAT VORBEHANDELTEN THP1 ZELLEN.....	53
4.5 AKTIVIERUNG UND ZYTOTOXISCHES POTENTIAL VON AUTOLOGEN $\gamma\delta$ T-ZELLEN GEGENÜBER TUMORZELLEN.....	56
4.6 GEGENÜBERSTELLUNG VON AKTIVIERUNG UND ZYTOTOXIZITÄT DER $\gamma\delta$ T-ZELLEN AUS DEN DURCHGEFÜHRTEN EXPERIMENTEN.....	63

5. DISKUSSION	66
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	81
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	83
LITERATURVERZEICHNIS.....	84
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

1. Einleitung

Kaum ein Gebiet in der Hämatologie und Onkologie hat so viele Hoffnungen, aber auch Enttäuschungen erlebt wie die Immuntherapie maligner Erkrankungen. Immuntherapien basieren zum einen auf den Mechanismen des unspezifischen, angeborenen Immunsystems. So stellt z.B. die Zytokintherapie mit Interleukin-2 und Interferon- α für bestimmte Tumorentitäten (malignes Melanom, Nierenzell-Karzinom) eine etablierte, wenn auch meist nebenwirkungsreiche, Standardtherapie dar.¹ Zum anderen kann auch das antigenspezifische, erworbene oder auch als adaptiv bezeichnete Immunsystem für therapeutische Ansätze genutzt werden. Trotz intensiver Forschung und Fortschritten im Bereich der Vakzinierung gegen definierte Tumorantigene (z.B. Melan-A oder gp100) fand sich bisher kein andauernder Erfolg und eine Etablierung dieser Therapie ist nicht erzielt worden. Passive Tumorstabilisierung mit monoklonalen Antikörpern hingegen hielt in den letzten Jahren einen breiten Einzug in die Klinik. So stellen zum Beispiel der anti-CD20 Antikörper Rituximab in der Behandlung von B-Zell-Lymphomen oder der anti-HER2/neu Antikörper Trastuzumab, für die das entsprechende Antigen exprimierenden Mamma-Karzinome etablierte, lebensverlängernde Therapien dar.¹

Neben den klassischen onkologischen Behandlungsformen – der Chemotherapie, der Strahlentherapie und der Tumorchirurgie – erscheint die Immuntherapie maligner Erkrankungen von untergeordnetem Stellenwert. Angesichts der meist hohen Rezidivwahrscheinlichkeit verbunden mit einer schlechten Prognose vieler Tumorerkrankungen bedarf es Therapien, die auch verborgene, residuelle Tumorzellen im Körper eliminieren. Die Nutzung der Potenz des menschlichen Immunsystems könnte hierfür einen hoffnungsvollen Ansatz bieten.

In den letzten Jahren nahmen das Wissen um die Bedeutung der Effektorzellen des natürlichen Immunsystems, wie der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), der NKT-Zellen und der $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich zu und Immuntherapien basierend auf diesen Zellen erhalten mehr und mehr an Bedeutung.

1.1 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Eine bemerkenswerte Zellpopulation des Immunsystems stellen die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten dar. Zusammen mit den B-Lymphozyten, den NK-Zellen und den $\alpha\beta$ T-Lymphozyten repräsentieren die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten die vier Lymphozyten-Linien des Menschen.

1986 wurde die Identifizierung dieses $\gamma\delta$ T-Zellrezeptors – neben dem $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor eine zweite Form des T-Zellrezeptors (TZR) – erstmals beschrieben.² Auch wenn $\gamma\delta$ T-Zellen viele Zelloberflächenproteine und immunbiologische Funktionen, wie die Sekretion von Zytokinen, die Regulation in der Immunantwort und die Zytotoxizität mit den $\alpha\beta$ T-Zellen gemeinsam haben, bestehen doch bemerkenswerte Unterschiede zwischen diesen beiden T-Zell-Populationen.

Im Gegensatz zu den „klassischen“, überwiegend vorkommenden $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, bilden die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit etwa 0,5 % bis 10 % aller T-Lymphozyten im peripheren menschlichen Blut eine kleine Fraktion.³ In epithelreichen Geweben dagegen, wie der Haut oder der Darmmukosa, können bis zu 50 % aller T-Zellen den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor tragen.⁴

Beide T-Zell-Rezeptorpopulationen stellen Heterodimere ($\alpha\beta$ - bzw. $\gamma\delta$ -Heterodimer) aus zwei Transmembranproteinen dar und sind mit dem so genannten CD3-Komplex assoziiert. Entgegen dem sehr polymorph vorkommenden $\alpha\beta$ -TZR erscheint das ausgebildete Repertoire des $\gamma\delta$ -TZR, charakterisiert durch eine variable γ -Kette ($V\gamma$) und eine variable δ -Kette ($V\delta$), weniger divers. Die größte Vielfalt zeigen $\gamma\delta$ T-Zellen in der vorgeburtlichen Entwicklung. Anschließend wird immer mehr die $V\gamma 9$ -Kette mit der $V\delta 2$ -Kette koexprimiert, bis schließlich 50 % bis max. 90 % der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im peripheren Blut einen $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR tragen. Dagegen dominieren in epithelialen Geweben wie der Haut oder der Darmmukosa meist Subpopulationen mit einer $V\delta 1$ -Kette zusammen mit einer variablen $V\gamma$ -Kette.⁵ Die Prädominanz einer einzelnen Subpopulation im peripheren Blut deutet auf eine antigen-getriebene

Expansion der V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten in den ersten Lebensjahren hin.⁶ Trotz dieser Prädominanz dürfen $\gamma\delta$ T-Zellen nicht als eine einheitliche Zellpopulation gesehen werden, hierzu differieren sie bezüglich molekularer, phänotypischer und funktioneller Charakteristika zu sehr.

1.2 Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

Schon in frühen Arbeiten wurde auf die besondere Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Infektabwehr geschlossen. Auf der intensiven Suche nach Liganden führten Lysate einer Vielzahl von gram⁺ und gram⁻ Bakterien, sowie auch von Protozoen zu einer Proliferation der V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten.⁷ Mykobakterielle Liganden wurden auf Grund ihrer stark aktivierenden Eigenschaft eingehend untersucht. Dabei fanden sich als V γ 9V δ 2 T-Zell Antigene nicht-peptidische Komponenten niedrigen Molekulargewichts (<3 kDa) mit einer essentiellen Phosphatgruppe, so genannte Phosphoantigene.⁸ Bei der genaueren Identifizierung der aktivierenden Antigene konnten neben Isopentylpyrophosphat (IPP) als Prototyp weitere intermediäre Metabolite des Mevalonatstoffwechsels identifiziert werden.⁹ IPP ist der ubiquitäre Schlüsselmetabolit in der Synthese von Cholesterol, Steroiden und Vitaminen, der in fast allen Zellen von Pro- und Eukaryonten durch den klassischen Mevalonatstoffwechsel synthetisiert wird. Einige Mikroorganismen hingegen nutzen einen für sie eigenen alternativen Mevalonatstoffwechselweg (Rohmerweg) zur Synthese von IPP, und die dabei entstehenden Zwischenprodukte führen als mikrobielle Phosphoantigene zu einer Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen.^{10;11} Die Bioaktivität dieser mikrobiellen Phosphoantigene ist um ein Vielfaches höher als die der durch den klassischen Mevalonatzklus der Säugetiere entstehenden Phosphoantigene, wodurch $\gamma\delta$ T-Zellen sensitiv und effektiv z.B. mit Mykobakterien infizierte Zellen erkennen können.⁹

Natürliche Phosphoantigene von gram⁺ und gram⁻ Bakterien können $\gamma\delta$ T-Zellen in nanomolaren Konzentrationen stimulieren. Durch chemische Modifikationen der natürlichen Liganden konnten stabile synthetische Phosphoantigene, wie das potente und V γ 9 δ 2 T-Zellen selektiv stimulierende phosphorylierte

Bromohydrin (BrHPP) abgeleitet werden.¹² Während eine unspezifische Bindung von BrHPP an eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren sogar im mikromolaren Bereich nicht erkannt wird, führen bereits nanomolare Konzentrationen von BrHPP zu einer spezifischen Antwort der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten. Zudem kann BrHPP durch eine relativ einfache Methode synthetisiert werden und ist somit ein attraktiver Kandidat zur Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen für Immuntherapien.¹²

Aminobisphosphonate (ABP) zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Phosphoantigenen und können ebenso selektiv in vitro und in vivo $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten aktivieren.^{13;14} Bisphosphonate sind eine Klasse von Medikamenten, die wegen ihrer Hemmung osteoklastischer Knochenresorption häufig zur Behandlung von Osteoporose und Tumor induzierten Knochenerkrankungen, wie Osteolyse oder Hyperkalziämie, eingesetzt werden. Während nicht Stickstoff enthaltende Bisphosphonate gegenüber $\gamma\delta$ T-Zellen inaktiv sind, können Aminobisphosphonate, wie Pamidronat, Alendronat und Ibandronat das selektive Auswachsen der $V\gamma9V\delta2^+$ Subpopulation aus peripheren Blutlymphozyten in vitro induzieren und auch in vivo wurden beispielsweise unter Behandlung mit Pamidronat vermehrt $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen.¹⁵ Die Aminobisphosphonate scheinen dabei selbst keine $V\gamma9V\delta2$ -Liganden darzustellen, sondern – wie mittlerweile gut belegt – indirekt durch ein Eingreifen in den Mevalonatstoffwechsel auf die $\gamma\delta$ T-Zellen zu wirken. ABP gelangen aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft nicht in pharmakologischen Konzentrationen in die Zelle. Bei phagozytierenden Antigen-präsentierenden Zellen oder Osteoklasten jedoch gelangen die ABP in klinisch verwendeten Dosierungen zu ihrer intrazellulären Zielstruktur, der Farnesylpyrophosphatsynthase (FPP-Synthase). Durch Hemmung der FPP-Synthase kommt es einer Akkumulation von vorgeschalteten Mevalonatstoffwechsel-Metaboliten (u.a. IPP), welche $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten stimulieren können.^{13;16;17}

Schon in frühen Arbeiten zur Antigenerkennung konnte die Proliferation von $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten durch zwei B-Zell-Tumorlinien, der Burkitt Lymphomlinie Daudi und der Myelomlinie RPMI-8226 nachgewiesen

werden.^{18;19} Trotz einer mittlerweile zahlreich beschriebenen Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Tumorzellen konnte noch kein speziell verantwortliches Tumorzellantigen bestimmt werden.

Die Antigenerkennung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten erfolgt in einer grundsätzlich verschiedenen Art und Weise wie die der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten. Während letztere zur Antigenerkennung zusätzlich Korezeptoren, CD4 und CD8 benötigen, exprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen in den meisten Fällen keinen dieser beiden Korezeptoren und werden deshalb auch als doppelt negative Zellen bezeichnet (CD4⁻CD8⁻). Ebenso benötigen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten auch keine Antigenprozessierung und -präsentation mit klassischen MHC-Klasse I bzw. MHC-Klasse II Molekülen und möglicherweise können sie – ähnlich wie Antikörper – direkt Antigene erkennen.^{20;21}

Bis heute fehlt der formale Beweis, dass Phosphoantigene an den $\gamma\delta$ -TZR binden und durch ihn erkannt werden. Ein starkes Argument für eine Beteiligung des $\gamma\delta$ -TZR an der Erkennung von Daudi-Zellen und Phosphoantigenen stellen Gentransferexperimente dar. Auf eine ursprünglich TZR-negative Empfängerlinie (Jurkat) lässt sich durch Gentransfer ein V γ 9V δ 2-TZR übertragen und ermöglicht so diesen Jurkat-V γ 9V δ 2-TZR-Transfektanten Phosphoantigene und Daudi-Zellen zu erkennen.²² Die Erkennung von Phosphoantigenen setzt auch das Vorhandensein eines bestimmten J-Segments (joining) in der V γ 9-Kette und die V δ 2-Kette voraus.²³ Wenn bisher noch nicht abschließend geklärt, sprechen doch viele Erkenntnisse für eine Beteiligung des $\gamma\delta$ -TZR an der Erkennung verschiedener Antigene.

Akzessorische Zellen und Membran-Interaktion sind zumindest eine Voraussetzung für eine optimale Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen. Phosphoantigene benötigen für eine Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen keine antigenpräsentierenden Zellen, allerdings sind direkte Zell-Zell-Kontakte – zumindest der $\gamma\delta$ T-Zellen untereinander – erforderlich und eine Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen vergrößert die $\gamma\delta$ T-Zellantwort.²⁰ N-haltige Bisphosphonate, wie Pamidronat, benötigen im Gegensatz zu den Phosphoantigenen für eine $\gamma\delta$ T-Zell-Antwort die Anwesenheit von Makrophagen oder dendritischen Zellen.²⁴

Neben dem TZR scheint für die Erkennung der zellulären Antigene, wie Tumorzellen oder infizierte Zellen, eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen eine wesentliche Rolle zu spielen.²⁵ Die meisten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten exprimieren Killer-inhibitory-Rezeptoren (KIRs), deren spezifische Interaktion mit verschiedenen MHC-Klasse I Allelen (v.a. HLA-C Allele) auf den Zielzellen durch ein negatives Signal die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zelle und somit deren Effektorfunktion unterdrückt, bzw. führt eine fehlende MHC-Klasse I Expression durch ein fehlendes negatives Signal zu einer Verstärkung der Effektorfunktion (so genanntes „missing self“ Konzept).^{26;27} So besitzen $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten, die normalerweise gegenüber MHC-I-negativen Daudi-Zellen zytotoxisch wirken, gegenüber genetisch veränderten MHC-I-positiven Daudi-Klonen ein geringeres lytisches Potential.²⁸ Dies deutet – neben einer TZR-abhängigen Zytotoxizität – auf einen zweiten, NK-Zell-ähnlichen Mechanismus der Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen hin. Allerdings konnte bei der Untersuchung einer Vielzahl von B-NHL-Zelllinien keine Korrelation von fehlender MHC-Klasse I Expression und deren Lyse gezeigt werden. So waren auch teils Lymphomzellen mit einer hohen MHC-I-Expression ein für $\gamma\delta$ T-Zellen sensibles Target, während Lymphomzellen mit niedriger MHC-I-Expression anerg waren.²⁹ Von spezieller Relevanz ist der aktivierende NKG2D Rezeptor, der neben seiner Expression auf NK-Zellen auch auf $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen gezeigt werden konnte. Die Liganden für NKG2D sind die MHC-Klasse I assoziierten Moleküle MICA und MICB, die als stressinduzierte Antigene von verschiedenen Tumorzellen oder infizierten Zellen exprimiert werden³⁰, sowie neu MHC-Klasse I assoziierte Moleküle – ULBP1-4 – die z.B. auf Daudi-Zellen nachgewiesen wurden.³¹ Die Expression solcher den NKG2D Rezeptor stimulierender Liganden wurde auf eine Reihe epithelialer Tumore, sowie auf gewissen hämatologischen Neoplasien gezeigt.³²⁻³⁴ Der NKG2D Rezeptor dient dabei nicht nur als kostimulatorisches Signal, sondern kann auch direkt – unabhängig vom TZR – $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen aktivieren.³⁵

1.3 Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen

Mit der Sekretion von Zytokinen, dem zytotoxischen Potential und mit ihrer Rolle in der Regulation der Immunantwort haben $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wesentliche Effektorfunktionen gemeinsam.

Menschliche $\gamma\delta$ T-Zellen können eine Vielzahl von Zytokinen – prinzipiell sowohl eine T_H1 -Antwort (z.B. $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$) als auch eine T_H2 -Antwort (z.B. IL-2, IL-4, IL-5, IL-10) – produzieren.³⁶ Nach Aktivierung werden vor allem die proinflammatorischen Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ freigesetzt, die beispielsweise für die Monozyten vermittelte Abtötung von Bakterien benötigt werden.^{13;37} Die Freisetzung dieser beiden T_H1 -Zytokine erfolgt in vitro bereits sehr schnell (2 Stunden) nach Kontakt des stimulierenden Antigens mit den $\gamma\delta$ T-Zellen.³⁸

Die Wanderung und Anlockung von Leukozyten ins Gewebe ist ein essentieller Schritt für die Entwicklung einer Immunantwort. Dieser Prozess wird kontrolliert durch die Interaktion von Chemokinen (chemotaktische Zytokine) mit ihren spezifischen Rezeptoren.³⁴ $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen exprimieren ein breites Spektrum von CC-Chemokin-Rezeptoren, einschließlich CCR1 und CCR5, welche nach Bindung von Chemokinen zu einer raschen Migration zu Entzündungsprozessen führen.³⁹ Interessanterweise können intraepitheliale und zirkulierende $\gamma\delta$ T-Zellen auch selbst eine Reihe von Chemokinen, wie Rantes, $MIP-1\alpha/\beta$ und IL-8 produzieren und könnten dadurch zur Rekrutierung von zirkulierenden Immunzellen beitragen.^{40;41}

Prinzipiell nutzen zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen zum einen direkte Zell-Zell-Kontakte über Oberflächenmoleküle um ihre Zielzellen zu lysieren. Dazu können unter anderem der Fas-Ligand (CD95L) oder der TNF-Rezeptor exprimiert werden, die nach Bindung an die Zielzelle apoptotische Vorgänge induzieren. Zum anderen kann Zytotoxizität über indirekte Signale mittels Zytokinen vermittelt werden. Eine häufige Methode der Zellyse ist die Freisetzung lytischer Granula nach Erkennung der Targetzelle. Diese enthalten Perforin, das Poren in den Membranen der Targetzellen bildet, und Granzyme, eine Gruppe unterschiedlicher Proteinasen, und können beide zum Zelltod führen. Perforin und Interferon- γ sind Schlüssel-Effektormoleküle in der

Immunantwort der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gegen Tumorzellen. Perforin-vermittelte Zytotoxizität wurde für V δ 2 und V δ 1 T-Zellen berichtet.⁴² Das lytische Potential von V γ 9V δ 2 T-Zellen wurde durch Hemmung der Perforin-Bildung gegenüber Tumorzellen eines Nierenzellkarzinoms komplett aufgehoben.⁴³ Darüber hinaus können beide Untergruppen den Fas-Ligand (FasL) exprimieren und Fas-empfindliche Tumorzellen lysieren.^{42;44} Neben dem Einfluss auf die Targetzellen kann eine Fas-FasL-Interaktion auch zu einem Zelltod aktivierter Effektorzellen führen (activation-induced cell death, AICD).

Betrachtet man die Effektorfunktionen im Hinblick auf Infektionserreger, so wurde die Expansion menschlicher $\gamma\delta$ T-Zellen in bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen beschrieben. Beispielsweise fanden sich die $\gamma\delta$ T-Zellen bei Brucellose, Salmonellose, Tuberkulose, Tularämie oder auch Malaria, Leishmaniose und Toxoplasmose erhöht.⁴⁵ Bei diesen Infektionen werden zumeist die V γ 9V δ 2 T-Zellen stimuliert. Bemerkenswert für die Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Immunabwehr ist ihre beachtliche Abnahme im Verlauf einer Lungentuberkulose oder einer AIDS-Erkrankung. Patienten mit einer aktiven Lungentuberkulose hatten im Vergleich mit Gesunden einen deutlich reduzierten Anteil von V γ 9V δ 2 T-Zellen im Blut und in der Lunge.⁴⁶ Bei im engen Kontakt mit Tuberkulose-Patienten stehendem gesunden Krankenhauspersonal wurde ein erhöhter Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut, sowie die Expression von Aktivierungsmarkern festgestellt.⁴⁷ Sowohl die proliferative Antwort als auch die zytolytische Aktivität von V γ 9V δ 2 T-Zellen im peripheren Blut waren bei HIV-1-seropositiven Patienten noch vor einem substantiellen CD4⁺ T-Zell-Verlust erheblich reduziert gegenüber HIV-1-seronegativen Patienten.⁴⁸ Interessanterweise war mit einem Ansprechen der HIV-Therapie diese Anergie der $\gamma\delta$ T-Zellen reversibel.^{49;50} In vitro werden V γ 9V δ 2 T-Zellen von HIV-infizierten Zellen zur Proliferation angeregt, zeigen zytotoxische Aktivität gegen die virusinfizierten Zellen und können durch die Produktion inhibitorischer β -Chemokine die Virusreplikation unterdrücken.⁵¹ Ob $\gamma\delta$ T-Zellen direkt oder indirekt gegen ein infektiöses Agens ihre Immunantwort vermitteln, ist weitestgehend unklar.

Eine weitere wesentliche Effektorfunktion der $\gamma\delta$ T-Zellen ist die Immunabwehr von maligne transformierten Zellen, die schon in frühen Arbeiten beobachtet wurde. In vitro konnte Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber einer Vielzahl von Tumorzelllinien – wie etwa gegen eine Reihe verschiedener B-NHL-Linien²⁹, gegen Zelllinien epithelialen Ursprungs des Kolons, der Niere, des Pankreas⁵², oder auch gegen Plasmozytom-¹³, Mammakarzinom-⁵³ und Neuroblastomzelllinien⁵⁴ – nachgewiesen werden. Für $\gamma\delta$ T-Zell-Klone aus dem peripheren Blut von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie konnte teilweise Zytotoxizität gegenüber autologen Tumorzellen nachgewiesen werden.⁵⁵ Nach allogener Knochenmarkstransplantation zeigten Langzeitüberlebende von Leukämien einen signifikant höheren Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut.⁵⁶

Interessanterweise kann das $\gamma\delta$ T-Zell empfindliche Tumorspektrum noch ausgedehnt werden. Zelllinien von Blasen-, Nieren-, Lungentumoren, sowie Myelom- und Osteosarkomlinien, die normalerweise keine Targets für V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten darstellen, konnten durch Vorbehandlung mit dem Aminobisphosphonat Pamidronat lysiert werden.⁵⁷

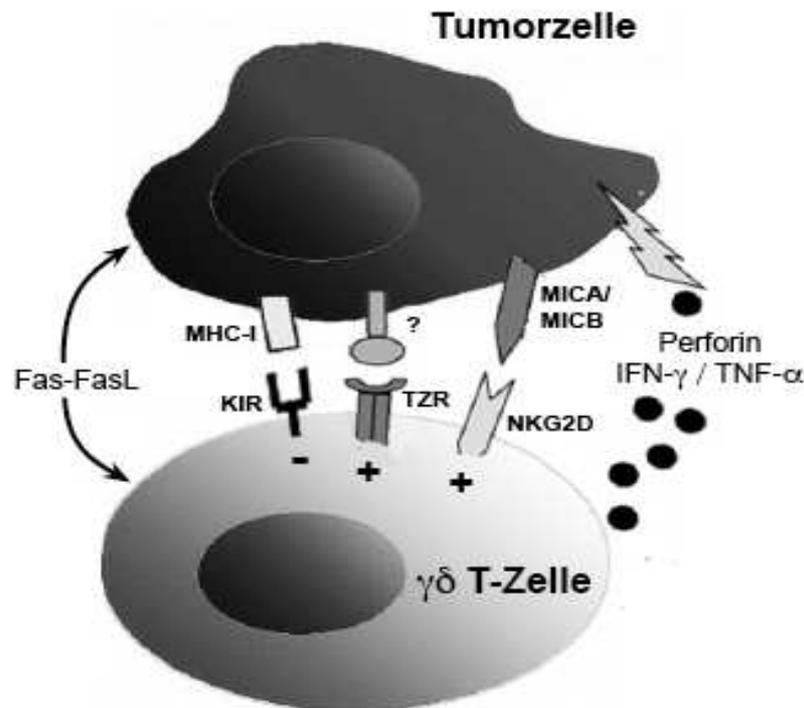


Abbildung 1: Ein System aktivierender und inhibitorischer Signale lässt $\gamma\delta$ T-Zellen ihre Effektorfunktionen – wie die Lyse von Tumorzellen – entwickeln. Die Freisetzung von Perforin und Interferon- γ , sowie die Fas-FasL-Interaktion sind wesentliche Mechanismen, über die Zytotoxizität vermittelt werden kann. Trotz einer mittlerweile zahlreich beschriebenen Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Tumorzellen konnte noch kein speziell verantwortliches Tumorzellantigen bestimmt werden.

1.4 Strategien der Immuntherapie maligner Erkrankungen mit $\gamma\delta$ T-Zellen

MHC-abhängige $\alpha\beta$ T-Zell Immuntherapie wird seit längerem diskutiert. Die Mehrzahl der menschlichen Tumore, die von MHC-Klasse I positiven Geweben abstammen, haben jedoch ihre MHC-Charakteristik verloren. Die Herunterregulation von MHC-Klasse I ist ein wichtiger Mechanismus des Tumors, um der T-Zell vermittelten Immunantwort zu entgehen und trägt zum fehlenden Erfolg einer MHC abhängigen Anti-Tumoraktivität der $\alpha\beta$ T-Zellen bei.⁵⁸ Durch die fehlende Abhängigkeit von dieser „klassischen“ Antigenprozessierung und -präsentation, sowie durch die spezifische

Erkennung eines breiten Spektrums an Phosphoantigenen und durch das Vorhandensein potenter synthetischer Antigene nehmen die $\gamma\delta$ T-Zellen eine besondere Stellung in der Erkennung maligner transformierter Zellen ein.

Strategien einer auf $\gamma\delta$ T-Zellen beruhenden Immuntherapie maligner Erkrankungen umfassen zum einen die in vitro Expansion von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit anschließendem Transfer, dem so genannten adoptiven Zelltransfer auf den Patienten. Mit synthetischen Phosphoantigenen – z.B. Bromohydrin – und Aminobisphosphonaten – z.B. Zoledronat – stehen potente Aktivatoren der $\gamma\delta$ T-Zellen zur Verfügung. In Gegenwart von IL-2 als essentiellm Wachstumsfaktor induzieren diese Liganden eine rasche Proliferation und eine selektive Anreicherung von $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten, die somit in großer Zellzahl für einen adoptiven Zelltransfer zur Verfügung stehen können.⁴³ In präklinischen Experimenten konnte die Anti-Tumoraktivität in vitro expandierter $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen nach adoptivem Transfer auf mit Tumorzellen versehene, immundefiziente Mäuse gezeigt werden.⁵⁹

Zum anderen können $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen direkt in vivo mittels BrHPP oder einem Bisphosphonat zusammen mit IL-2 aktiviert werden. Für Bromohydrin werden momentan Phase I Studien zusammen mit IL-2 an Patienten mit Nierenzellkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom durchgeführt.^{60;61} In einer ersten Pilotstudie konnte durch das N-BP Pamidronat in Kombination mit IL-2 ein objektives Ansprechen von Lymphom- und Myelompatienten gezeigt werden.⁶²

2. Ziele der Untersuchungen

Gegenüber welchen Tumoren und in welchem Umfang sich das zytotoxische Potential der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ausbilden lässt, ist eine der grundlegenden Fragen der Diskussion um die Bedeutung von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immuntherapie. Eine breite *in vitro* Testung mit einem zuverlässigen, praktikablen Testverfahren, anhand dessen sich das Spektrum und die Sensibilität von Tumorzellen erschließen lässt, könnte zum besseren Verständnis des zytotoxischen Potentials der $\gamma\delta$ -T-Zellen beitragen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die *in vitro* Proliferation von V γ 9V δ 2 T-Zellen mit Ausbildung ihrer Zytotoxizität gegen Tumorzellen nach der Stimulation mit BrHPP und mit dem Bisphosphonat Zoledronat in Anwesenheit von IL-2 untersucht werden. Als Parameter für die Anti-Tumoraktivität wurden der Aktivierungsmarker CD69 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Inkubation mit Tumorzellen gemessen und auf LDH-Freisetzung basierende Zytotoxizitätstests aktivierter $\gamma\delta$ -T-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzellen hämatologischen Ursprungs durchgeführt. Neben den Zytotoxizitätsassays mit stark angereicherten, heterologen $\gamma\delta$ -T-Zellen gesunder Normalspender gegenüber Tumorzellen von Patienten, sollte die Testung in einem autologen System – mit $\gamma\delta$ -T-Zellen und Tumorzellen eines Patienten – evaluiert werden.

In vitro Testungen sind die Voraussetzung, um Rückschlüsse auf eine mögliche Immuntherapie mit $\gamma\delta$ -T-Zellen am Patienten zu ziehen. Diese Arbeit sollte ein Testverfahren demonstrieren, anhand dessen $\gamma\delta$ -T-Zellen effektiv aktiviert und expandiert werden können und anhand dessen die Anti-Tumoraktivität der $\gamma\delta$ -T-Zellen gegenüber Tumorzellen bestimmt und Einflüsse untersucht werden können. Neben klinischen Aspekten könnte zukünftig eine *in vitro* Testung eine rationale Entscheidungshilfe für den Einsatz einer Immuntherapie mit $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten darstellen.

3. Material und Methoden

3.1 Medien

Supplementiertes RPMI-Medium

500 ml RPMI-Medium (Life Technologies, Paisley, Schottland) wurden zusammen mit einem Antibiotikagemisch aus Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml, Biochrom, Berlin) sowie L-Glutamin (2 mM, Life Technologies, Paisley, Schottland) sterilfiltriert (< 0,2 µm sterile Membranfilter, Schleicher & Schuell, Dassel).

1 %iges FCS-Medium

Fötales Kälberserum (FCS) (Sigma, Deisenhofen) wurde zur Komplementinaktivierung 30 Minuten bei 56 °C inkubiert, anschließend sterilfiltriert (Minisart Plus 0,2 µm Membranfilter mit GF-Vorfilter, Sartorius, Göttingen) und 1:100 mit supplementiertem RPMI-Medium verdünnt.

10 %iges FCS-Medium

Fötales Kälberserum (FCS) (Sigma, Deisenhofen) wurde zur Komplementinaktivierung 30 Minuten bei 56 °C inkubiert, anschließend sterilfiltriert (Minisart Plus 0,2 µm Membranfilter mit GF-Vorfilter, Sartorius, Göttingen) und 1:10 mit supplementiertem RPMI-Medium verdünnt.

10 %iges AB-Medium

10 ml humanem AB-Serum (PAA Laboratories, Linz, Österreich) wurde mit 90 ml supplementiertem RPMI-Medium gemischt und sterilfiltriert.

10 %iges AB-Medium mit 100 IE/ml IL-2

10000 IE IL-2 (Proleukin, EuroCetus, Frankfurt) wurden in 10 ml humanem AB-Serum (PAA Laboratories, Linz, Österreich) aufgenommen, mit 90 ml supplementiertem RPMI-Medium gemischt und sterilfiltriert.

Einfriermedium

Die gewünschte Zellzahl wurde in 40 %iges FCS-Medium (Zubereitung entsprechend 10 %igem FCS-Medium) aufgenommen und unmittelbar vor dem Einfrieren wurde das gleiche Volumen an supplementiertem RPMI-Medium mit 20 % DMSO (Sieigma, Deisendorf) zugegeben.

3.2 Antikörper

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden folgende Antikörper verwendet:

Antigen	Isotyp	Klon	Konjugation	Quelle
CD2	IgG2a	39C1.5	FITC	Coulter-Immunotech (Hamburg)
CD3	IgG1 (Maus)	UCHT1	PE	Coulter-Immunotech (Hamburg)
CD3	IgG1 (Maus)	UCHT1	APC	BD Biosciences (Heidelberg)
CD10	IgG1, κ (Maus)	HI10a	PE	BD Biosciences (Heidelberg)
CD19	IgG1, κ (Maus)	HIB19	FITC	BD Biosciences (Heidelberg)
CD33	IgG1, κ (Maus)	WM53	PE	BD Biosciences (Heidelberg)
CD34	IgG1, κ (Maus)	581	PE	BD Biosciences (Heidelberg)
CD38	IgG1, κ (Maus)	HIT2	PE	BD Biosciences (Heidelberg)
CD69	IgG2b	TP1.55.3	PE	Coulter-Immunotech (Hamburg)
CD117 (c-kit)	IgG2a, κ (Maus)	95C3	PE	Coulter-Immunotech (Hamburg)
CD138	IgG1 (Maus)	BB4	PE	Coulter-Immunotech (Hamburg)
κ -Kette/ CD19	IgG (Ziege)/ IgG1 (Maus)	Polyklonal/ J4.119	FITC/ PE	Coulter-Immunotech (Hamburg)
λ -Kette/ CD19	IgG (Ziege)/ IgG1 (Maus)	Polyklonal/ J4.119	FITC/ PE	Coulter-Immunotech (Hamburg)
HLA-ABC	IgG2a (Maus)	B9.12.1	FITC	Coulter-Immunotech (Hamburg)
pan- $\gamma\delta$	IgG1 (Maus)	IMMU 510	FITC	BD Biosciences (Heidelberg)
$\gamma\delta$ -TCR	IgG1, κ (Maus)	B1	APC	BD Biosciences (Heidelberg)

3.3 Zellen

PBL

Mittels Leukopherese gewonnene periphere Blutlymphozyten (PBL) zweier gesunder Normalspender (Normalspender A, männlich, 25 Jahre und Normalspender B, männlich, 35 Jahre) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque, Pharmacia, Uppsala, Schweden) isoliert, zweimal mit je 10 ml 1 %igem FCS-Medium gewaschen und der jeweilige Normalspender direkt für den Ansatz verwendet.

Zelllinien

Zelllinie	DSMZ-Nr.	Zelltyp
THP1	ACC 16	Akute monozytäre Leukämie
Daudi	ACC 78	Burkitt Lymphom
U-266	ACC 9	Multiples Myelom

Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und lagen kryokonserviert vor.

Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus venösem Vollblut der Patienten isoliert, mittels magnetischer Zellseparation als Positivselektion angereichert (siehe Kap. 3.6.) und direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zum Auftauen wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml 1 %igem FCS-Medium gewaschen, zum Ausschluss der toten Zellen mit Trypanblau (0,2 %ig, Merck, Darmstadt) gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Diagnosen der ausgewählten Patienten werden im Ergebnisteil aufgeführt.

3.4 Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen

PBL des jeweiligen Normalspenders wurden aus venösem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque, Pharmacia, Uppsala, Schweden) isoliert, anschließend die Zellen je zweimal mit 1 %igem FCS-Medium

gewaschen und gezählt. Je Well wurden 1×10^5 Zellen in 100 μ l 10 %igem AB-Medium mit 100 IE/ml IL-2 und mit 1 μ M BrHPP in 96-Well-Rundbodenplatten (Greiner, Frickenhausen) bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Zugabe von 25 μ l 10 %igen AB-Mediums mit 100 IE/ml IL-2 je Well erfolgte nach 3, 7 und 10 Tagen. Eine Fütterung über Tag 13 hinaus wurde im Zwei-Tages-Rhythmus (Tag 12, 14, etc.) durchgeführt, wobei der Abstand zwischen letzter Fütterung mit AB-IL2-Medium und Verwendung der Zellen für das Zytotoxizitäts-Assay ebenso 2 Tage betrug (z.B. letzte Fütterung Tag 14, Assay Tag 16). Die Kultivierungsdauer der für die Experimente verwendeten $\gamma\delta$ T-Zellen variierte zwischen 12 und 16 Tagen.

3.5 Kultur der Zelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden in 10 %igem FCS-Medium in Zellkulturplatten oder Zellkulturflaschen verschiedener Größe (abhängig vom Volumen des Mediums) bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Verdünnungen erfolgten zwei- oder dreimal pro Woche (je nach Zellteilungsrate) mit frischem Medium, so dass die Zelldichte zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml gehalten wurde. Bei zu großer Anreicherung toter Zellen in der Kultur wurden diese mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt.

3.6 Isolierung von Tumorzellen aus venösem Vollblut

Die Tumorzellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus venösem Vollblut der Patienten gewonnen und anschließend durch magnetische Zellseparation, MACS (Magnetic Cell Sorting), isoliert. Dazu mussten die Zielzellen indirekt markiert werden, indem sie zunächst mit einem Antikörper gegen ein charakteristisches Oberflächenantigen (z.B. für AML-Blasten: CD33-AK, PE konjugiert) inkubiert wurden. Der jeweilige Antikörper wird im Experimententeil aufgeführt und ist unter Kapitel 3.2 näher beschrieben. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit MACS Anti-FITC MicroBeads bzw. MACS Anti-PE MicroBeads inkubiert. Anschließend konnten mit dem Zellseparator VarioMACS die Tumorzellen als Zielzellen magnetisch isoliert

werden. Dabei verwendete Positiv-Selektionssäulen, MACS Anti-FITC bzw. Anti-PE MicroBeads, Puffer, Filter und der Zellseparator VarioMACS stammten von der Firma Milteny Biotec, Bergisch Gladbach. Für die genaue Verfahrensweise sei auf die Protokolle des Herstellers verwiesen, die exakt eingehalten wurden. Die Effizienz der Positivselektion wurde mittels der Durchflusszytometrie quantifiziert. Die angereicherten Tumorzellen wurden entweder direkt oder nach zwischenzeitlicher Kryokonservierung für die Experimente verwendet. Für einige Experimente diente noch zusätzlich die nach der Positivselektion übrig gebliebene Tumorzell-negative Zellfraktion im Zytotoxizitäts-Assay als Negativkontrolle.

3.7 Isolierung von Tumorzellen aus Lymphknoten

Die Tumorzellen für das in Kapitel 4.5 beschriebene Experiment stammten aus einem occipitalen Lymphknoten des Patienten. Es erfolgte eine Aufklärung des Patienten und dieser gab schriftlich seine Einverständniserklärung ab. Unmittelbar nach der operativen Entfernung wurde das ungefähr 1cm x 1cm x 1cm große Präparat gemäß der Empfehlung der "Current Protocols in Immunology", Vol.2 (John E. Coligan et al.), nach dem Protokoll 'Isolation of Mononuclear Cells from Tonsillar Tissue' aufbereitet und die Tumorzellen bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

3.8 Messung der Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Ansatz

Der Experimentaltteil untersucht im Kapitel 4.2 die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Tumorzellen. Von den frisch gewonnenen PBL des Normalspenders A bzw. B wurden hierzu 2×10^4 PBL je Well zusammen mit frisch gewonnenen oder aufgetauten Tumorzellen in einem Bereich von 2×10^4 bis 8×10^5 Tumorzellen je Well inkubiert. Die dabei gewählten Ratios betragen (PBL:Tumorzellen) 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, jeweils in Dreifachkontrollen (triplicate) in einer 96-Well-Rundbodenplatte (Greiner, Frickenhausen). In jedem Well befanden sich die PBL in 100 μ l 10 %igem AB-Medium zusammen mit den

Tumorzellen in 100 μ l 10 %igem FCS-Medium. Ebenfalls in Dreifachbestimmungen wurden als Negativkontrolle 2×10^4 PBL/Well allein in 200 μ l 10 %igem AB-Medium und als Positivkontrolle 2×10^4 PBL/Well in 200 μ l 10 %igem AB-Medium mit 1 μ M/BrHPP mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer (FACScan).

Diesem Ansatz entsprechend wurde die Aktivierung der Normalspender A und B durch die Zelllinien THP1 und Daudi untersucht, ebenfalls in den Verhältnissen (PBL:THP1 bzw. PBL:Daudi) 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40. THP1 diente als eigentliche Negativkontrolle und Daudi als eigentliche Positivkontrolle für eine Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen und wurde als Mittelwert aus 2 Experimenten für jeden Normalspender einer Aktivierung durch Tumorzellen direkt gegenübergestellt.

FACS-Analyse

Die Expression des Oberflächenantigens CD69, als früher Aktivierungsmarker, wurde zur Bestimmung der Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen. Nach 12 Stunden wurden dafür die zu analysierenden Wells in FACS-Analyse-Röhrchen pipettiert, mit einer je nach Hersteller entsprechenden Menge Antikörper für 15 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert und anschließend, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, in PBS (Phosphate Buffered Saline) mit 1 % FCS und 2 mM EDTA gewaschen. Das PBL-Tumorzell-Gemisch wurde dabei dreifach gefärbt: mit FITC markiertem Antikörper gegen pan- $\gamma\delta$, mit PE markiertem Antikörper gegen CD69, mit APC konjugiertem Antikörper gegen CD3 und zur FACS-Analyse ungefähr 50 % der ursprünglich im Well enthaltenen Zellen in das Durchflusszytometer aufgenommen. Anhand der Größe (Vorwärtsstreuung - FCS) und Granularität (Seitwärtsstreuung - SSC) konnte zunächst die Region der Lymphozyten grob identifiziert werden (Region 1). Aus dieser Region konnten in einem zweiten Auswertungsschritt die CD3-APC markierten Zellen (= alle T-Zellen) klar differenziert werden (Region 2). Die Verknüpfung der beiden Regionen ermöglichte, Zellen, die sich sowohl in Region 1 als auch in Region 2 befanden, zweidimensional gegen pan- $\gamma\delta$ -FITC und CD69-PE

aufzutragen. Diese Anschauung zeigt als Ergebnis den Anteil von aktivierten (CD69-positiven) $\gamma\delta$ T-Zellen an allen $\gamma\delta$ T-Zellen.

Die Verwendung des dritten Farbstoffes CD3-APC erlaubte eventuelle unspezifisch bindende Makrophagen oder Tumorzellen klar auszugrenzen. Dieser Standardansatz wurde bezüglich der Kulturplatten, der Zellkonzentrationen, der Färbung und Auswertung in zahlreichen Vorversuchen modifiziert.

3.9 Bestimmung der Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Im Kapitel 4.3 des Experimentalteils wurden $\gamma\delta$ T-Lymphozyten der Normalspender A und B bezüglich ihrer Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen verschiedener Patienten und parallel dazu gegenüber den Zelllinien THP1 (als Negativkontrolle) und Daudi (als Positivkontrolle) untersucht. Zur Quantifikation von Zelllyse und Zelltod wurde ein Zytotoxizitätstest basierend auf der Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität verwendet.

Material

- Assay Medium: 1640 RPMI ohne Phenolrot (Gibco, Invitrogen Cooperation) mit 1 % menschlichem Albumin (Human Albumin 20% Immuno, Baxter, Heidelberg)
- 96-V-Well-Platte (Greiner, Frickenhausen)
- 96-Well-Flachbodenplatte, optisch klar (Greiner, Frickenhausen)
- 2% Triton X 100 in 1640 RPMI-Medium ohne Phenolrot
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH), (Roche Diagnostics, Mannheim)
- ELISA-Reader (Titertek Multiskan PLUS, MK II, Typ 314, Labsystems, Finnland) mit 492 nm Filter und Auswertungssoftware (Ascent Software™, Labsystems, Finnland)

Ansatz

Während die Zelllinien Daudi und THP1 aus Zellkultur stammten, wurden die Tumorzellen von Patienten direkt nach der Isolation oder nach Kryokonservierung verwendet. Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten – als Effektorzellen –

wurden über 14 Tage mit 1 BrHPP und IL2 angereichert und stimuliert (siehe Kapitel 3.4). Unmittelbar vor dem Ansatz wurden tote Targetzellen (Tumorzellen, Daudi, THP1) und tote Effektorzellen ($\gamma\delta$ T-Zellen) mittels Dichtezentrifugation entfernt. Von drei anschließenden Waschschrritten erfolgte der letzte mit Assay-Medium, um die in FCS enthaltene LDH zu entfernen. Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wurden auf $2,5 \times 10^5$, 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$ und 5×10^3 Zellen je Well verdünnt, um mit den Targetzellen (5×10^3 Zellen/Well) in einem Verhältnis (Effektor:Target) von 50:1, 10:1, 5:1, 1:1 in einem 96-V-Well inkubiert zu werden.

Folgende Kontrollen mussten zur Bestimmung der Zytotoxizität in jedem Experiment durchgeführt werden:

- spontane LDH-Freisetzung des Assay-Mediums (180 μ l Assay-Medium/Well)
- spontane LDH-Freisetzung der Effektorzellen (je nach Ratio 5×10^3 bis $2,5 \times 10^5$ $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Well)
- spontane LDH-Freisetzung der Targetzellen (Daudi, THP1 bzw. Tumorzellen je 5×10^3 /Well)
- maximale LDH-Freisetzung der Targetzellen (je 5×10^3 Zellen/Well mit 1% Triton X 100)

Das Endvolumen der Zellen betrug in allen Wells 180 μ l. Zur Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung erwies es sich als günstig, 90 μ l Targetzellen mit 90 μ l 2 %igem Triton X 100 (Endkonzentration 1 % im Well) zusammenzugeben. Alle Ratios und Kontrollen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt und für 4 Stunden bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Messung

Nach erfolgter Inkubation wurden die 96-V-Well-Platten für 10 Minuten mit 250 x g zentrifugiert und anschließend 90 μ l eines jeden Wells in ein entsprechendes Well einer optisch klaren 96-Well-Flachbodenplatte transferiert. Dabei vermied eine vorsichtige Abnahme das Aufmischen der durch die Zentrifugation am Boden abgesetzten Zellen, so dass ein zellfreier Überstand mit LDH, freigesetzt aus Zellen mit beschädigter Plasmamembran, gewonnen

wurde. Umgehend folgte mittels einer Multipipette die Zugabe von 90 µl der Reaktionsmischung (= Cytotoxicity Detection Kit) in jedes Well und eine Inkubation von 30 Minuten, lichtgeschützt und bei Zimmertemperatur.

Die Menge toter Zellen oder Zellen mit Plasmamembran-Schädigung geht mit einem Anstieg der LDH-Enzymaktivität einher. Durch die Reaktionsmischung korreliert der Anstieg der LDH-Enzymaktivität direkt mit der Umwandlung von Tetrazolium-Salz (gelb) in Formazan-Salz (rot) innerhalb einer gewissen Zeitspanne, wodurch die Stärke der rötlichen Farbentwicklung proportional die Zahl der lysierten Zellen widerspiegelt.

Mit Hilfe eines ELISA-Readers wurde nach 30 Minuten spektrophotometrisch die Farbentwicklung als Absorption bei 492 nm gemessen.

Aus allen bestimmten Dreifachwerten wurde jeweils der Mittelwert gebildet und von jedem die Absorption des Assay-Mediums abgezogen.

Die prozentuale Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den Tumorzellen, Daudi und THP1 wurde mit der folgenden Formel für das jeweilige Target und für die jeweilige Ratio bestimmt:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Effektor-Target-Zellmix} - \text{Effektoreigenkontrolle} - \text{Targeteigenkontrolle}}{\text{Targetmaximum} - \text{Targeteigenkontrolle}} \times 100$$

Effektor-Target-Zellmix: Absorption des Effektor-Target-Zellgemischs

Effektoreigenkontrolle: Absorption der $\gamma\delta$ T-Zellen allein

Targeteigenkontrolle: Absorption der Tumorzellen allein,

bzw. Daudi oder THP1 allein

Targetmaximum: maximal mögliche Absorption dieser Zellen durch Triton X 100

Aus dem mathematischen Ansatz für die Zytotoxizität heraus konnten sich im Rahmen der Messungenauigkeit leicht negative Werte ergeben, die gleich Null gesetzt wurden. Im Falle einer ins Positive reichenden Standardabweichung wurde diese in den Diagrammen mitaufgetragen.

Enzymatische Nachweisreaktion

Die LDH-Aktivität des zellfreien Überstandes wird in einem enzymatischen Test bestimmt. Die Reaktionsmischung enthält u.a. Diaphorase, NAD^+ , Tetrazolium-Salz, Laktat und muss unmittelbar vor der Verwendung aus zwei Lösungen gemischt werden. In einem ersten Schritt wird NAD^+ zu NADH/H^+ durch einen LDH-katalysierten Übergang von Laktat in Pyruvat reduziert. In einem zweiten Schritt überträgt die Diaphorase als Katalysator H/H^+ von NADH/H^+ auf das Tetrazolium Salz (blass-gelb), welches dadurch zu Formazan-Salz (rot) reduziert wird. Der Anstieg der LDH-Enzymaktivität im Zellüberstand korreliert direkt mit der Menge von Formazan (rot) innerhalb einer gewissen Zeitspanne. Der Formazan-Farbstoff ist wasserlöslich und zeigt ein breites Absorptionsmaximum bei 500 nm, wohingegen das Tetrazolium Salz keine signifikante Absorption bei diesen Wellenlängen zeigt.

3.10 Geräte

Durchflusszytometer:	FACScan und FACS Calibur (Becton Dickonson) CellQuest 1.0 als Messungs- und Analysesoftware
Zentrifugen:	Rotanta/AP mit Rotor 5094A (Hettlich, Tuttlingen) 3K-2 Kühlzentrifuge, max. 800 x g (Sigma)
Sterilbank:	Biogard 1360-112 (Sanford, Maine, USA)
Vortex:	Vortex Genie 2™ (Bender & Hobein, Zürich)
Brutschrank:	Forma Scientific Water Jacketed Incubator, Modell 3164, 5 % CO_2 , 37 °C (Labotect, Göttingen)
Photometer:	Ultrospec 1000 UV-VIS Spectrophotometer (Pharmacia, Freiburg)
Autoklaven:	Melag Dampfautoklav Typ 23 (Melag) Varioklav Dampfsterilisator Typ 300/400/500 EP-Z (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
Kryokonservierung:	Nicool plus (Air Liquide, Düsseldorf)
Elisa-Reader:	Titertek Multiskan PLUS MK II, Typ 314 Ascent Software™ (Labsystems, Finnland)

4. Ergebnisse

4.1 Proliferation und Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch BrHPP

Zur Untersuchung der Aktivierung und des zytotoxischen Potentials von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Tumorzellen wurde in den Experimenten dieser Arbeit auf Zellen zweier gesunder Spender zurückgegriffen (Normalspender A bzw. B, 25 bzw. 35 Jahre, beide männlich und gesund). Gemischte Lymphozytenpopulationen (PBL) des jeweiligen Spenders wurden aus venösem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Zur Proliferation und Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde das synthetische, hoch aktive Phosphoantigen Bromhydrinpyrophosphat (BrHPP) in Anwesenheit von niedrig dosiertem Interleukin 2 (IL-2) – als exogenem Wachstumsfaktor – verwendet. Je Well wurden 1×10^5 Zellen der gemischten Lymphozytenpopulation mit 100 IE/ml IL-2 und mit 1 μ M BrHPP in 96-Well-Rundbodenplatten inkubiert. Eine Zugabe des Mediums mit 100 IE/ml IL2 je Well erfolgte nach 3, 7 und 10 Tagen. Die Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen wurde mittels PE-markierten Antikörpern gegen CD3 und pan- $\gamma\delta$ -FITC-Antikörpern durchflusszytometrisch an verschiedenen Tagen gemessen. Aus Voruntersuchungen war bereits bekannt, dass es zu einem selektiven Auswachsen von $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten kommt. Zur Vereinfachung wurde deswegen in allen Experimenten dieser Arbeit der pan- $\gamma\delta$ -Antikörper verwendet.

In Abbildung 2 ist exemplarisch eine durchflusszytometrische Messung des Normalspenders A am Tag 0, 6 und 13 aufgeführt. Der relative Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen des Spenders A stieg von 4,1 % am Tag 0 auf 86,2 % aller T-Zellen am Tag 13. Die absolute Zellzahl der ganzen gemischten Lymphozytenpopulation betrug das 2,6-fache nach 13 Tagen. Somit fand sich eine deutliche selektive Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer Zunahme der absoluten Zellzahl durch das Phosphoantigen BrHPP.

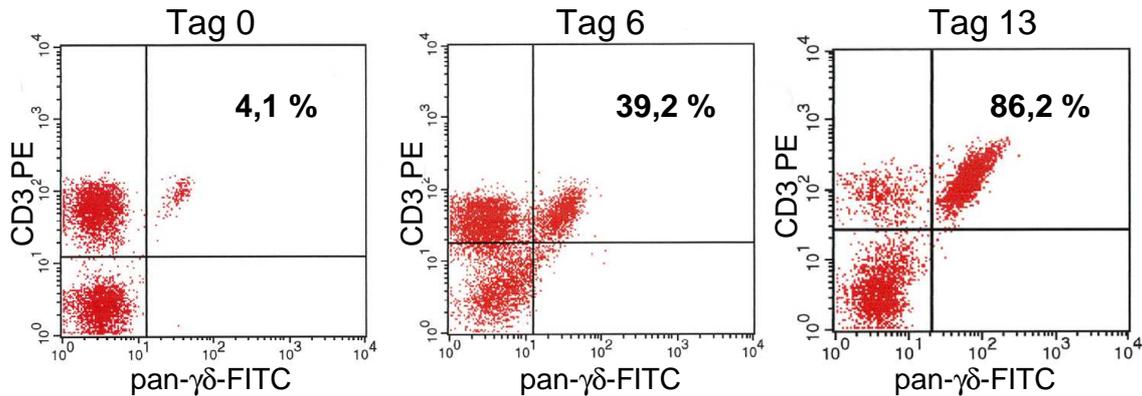


Abbildung 2: Periphere Blutlymphozyten des Normalspenders A wurden über 13 Tage mit 1 μ M BrHPP in Anwesenheit von IL2 stimuliert. Neben einer Zunahme der absoluten Zellzahl kam es zu einer selektiven Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen (hier ersichtlich als Doppelfluoreszenz im rechten oberen Quadranten) im Bezug auf alle T-Zellen (rechter und linker oberer Quadrant).

In den weiteren Anreicherungen für die folgenden Zytotoxizitätsassays lagen die Werte für Normalspender A und B in derselben Größenordnung. Dabei verdoppelte bis vervierfachte sich die Gesamtzahl der ursprünglich kultivierten PBL in diesem Zeitraum, wobei der Anteil der $\gamma\delta^+$ T-Zellen von 4 % - 6 % am Tag 0 auf 75 % - 92 % aller T-Zellen am Tag 13 anstieg (die jeweiligen Werte werden zum Zytotoxizitätsassay angegeben). Nach etwa 13 Tagen waren die $\gamma\delta$ T-Zellen maximal angereichert. Tag 13 stellte jedoch einen variablen Zeitpunkt dar, so wurden bereits wenige Tage zuvor und unter weiterer IL-2-Zugabe bis Tag 18 annähernd hohe Anreicherungen erzielt. Nach Tag 18 fielen sowohl die Gesamtzellzahl, als auch der $\gamma\delta$ -Anteil deutlich ab. Die Kultivierungsdauer der für die Experimente verwendeten $\gamma\delta$ T-Zellen variierte zwischen 12 und 16 Tagen. Bei der Verwendung der Zellen wurde, um einen unspezifischen Einfluss auf das Zytotoxizitätsassay zu vermeiden, auf einen Abstand von 2 Tagen zur letzten IL-2-Zugabe geachtet.

Neben der Expansion führt BrHHP in Anwesenheit von IL-2 auch zu einer Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen. Im Rahmen dieser Stimulation verändert sich die Expression von Oberflächenproteinen auf Zellen. CD69 gilt als früher

Aktivierungsmarker auf T-Zellen und wurde per FACS-Analyse mittels PE-gekoppelter Antikörper gegen CD69 und FITC-gefärbten pan- $\gamma\delta$ -Antikörpern gemessen. $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen FITC-Fluoreszenz und sind in Abbildung 3 jeweils in den rechten oberen und unteren Quadranten dargestellt. Aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen binden zusätzlich CD69 und befinden sich als Doppelfluoreszenz im rechten oberen Quadranten. Nach 13 Tagen exprimierten deutliche 36,9 % aller $\gamma\delta$ T-Zellen des Spenders A CD69 und waren somit aktiviert.

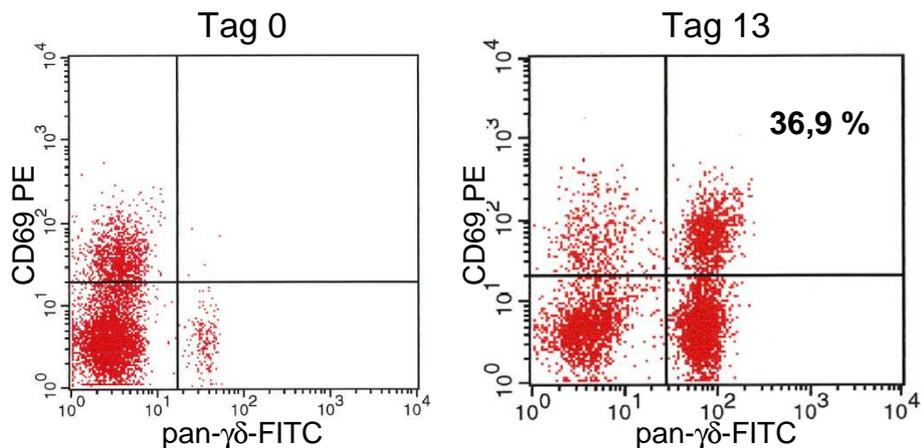


Abbildung 3: Nach 13-tägigem Ansatz mit 1 μ M BrHPP und IL2 kam es als Zeichen der Aktivierung zu einer deutlichen Zunahme der CD69 Expression (sichtbar als Doppelfluoreszenz im rechten oberen Quadranten bezogen auf alle $\gamma\delta$ T-Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten).

Zusammenfassend wurde hiermit die selektive Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen aus den PBL gesunder Spender und als Zeichen ihrer Aktivierung die CD69-Expression durch BrHHP unter Zusatz von IL-2 gezeigt.

4.2 Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Tumorzellen

4.2.1. Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Tumorzelllinien

Bestimmte Tumorzellen besitzen die Eigenschaft $\gamma\delta$ T-Zellen in vitro zu aktivieren. In den nachfolgenden Experimenten wurden native periphere Blutlymphozyten – ohne weitere Aktivierung durch IL-2 oder ABP – der beiden

Normalspender mit einem Anteil zwischen 4 % bis 8 % $\gamma\delta$ T-Zellen bezüglich ihrer Aktivierung durch Tumorzelllinien untersucht.

Von den frisch gewonnenen gemischten Lymphozytenpopulationen wurden hierzu 2×10^4 PBL je Well zusammen mit Tumorzelllinien aus Kultur in einem Bereich von 2×10^4 bis 8×10^5 Tumorzellen je Well inkubiert. Die dabei gewählten Verhältnisse betragen (PBL : Tumorzellen) 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 und eventuell 1:40, jeweils in Dreifachkontrollen. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden folgte die Analyse im Durchflusszytometer mittels PE-gekoppelter Antikörper gegen CD69 und FITC-gefärbten pan- $\gamma\delta$ -Antikörpern. Die Verwendung des dritten Farbstoffs CD3-APC erlaubte eventuelle unspezifisch bindende Makrophagen oder Tumorzellen klar auszugrenzen.

Diesem Ansatz entsprechend wurde die Stimulation durch die Zelllinien THP1 (akute monozytäre Leukämie) und Daudi (Burkitt Lymphom) analysiert. Die Abbildung 4 veranschaulicht die $\gamma\delta$ -Aktivierung des Spenders A als Prozentsatz der CD69 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen in Bezug auf alle $\gamma\delta$ T-Zellen. Auch in 20-fach höherer Konzentration von THP 1 kam es nur zu einem kleinen Anstieg der CD69-Expression. Somit waren die $\gamma\delta$ T-Zellen weitestgehend anerg gegenüber der myelomonozytären Zelllinie THP1, die deswegen in den weiteren Experimenten als Negativkontrolle mitgeführt wurden. Hingegen fand sich in diesen Untersuchungen eine deutliche Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Lymphom-Zelllinie Daudi. In 20-fach höherer Konzentration waren 72,3 % der $\gamma\delta$ T-Zellen nach 12 Stunden stimuliert. Daudi gilt als klassisches Target für $\gamma\delta$ T-Zellen. Ein Mittelwert aus 2 Experimenten für jeden Normalspender wurde als Positivkontrolle in den nachfolgenden Versuchen zur Aktivierung der Negativkontrolle und den Tumorzellen gegenübergestellt.

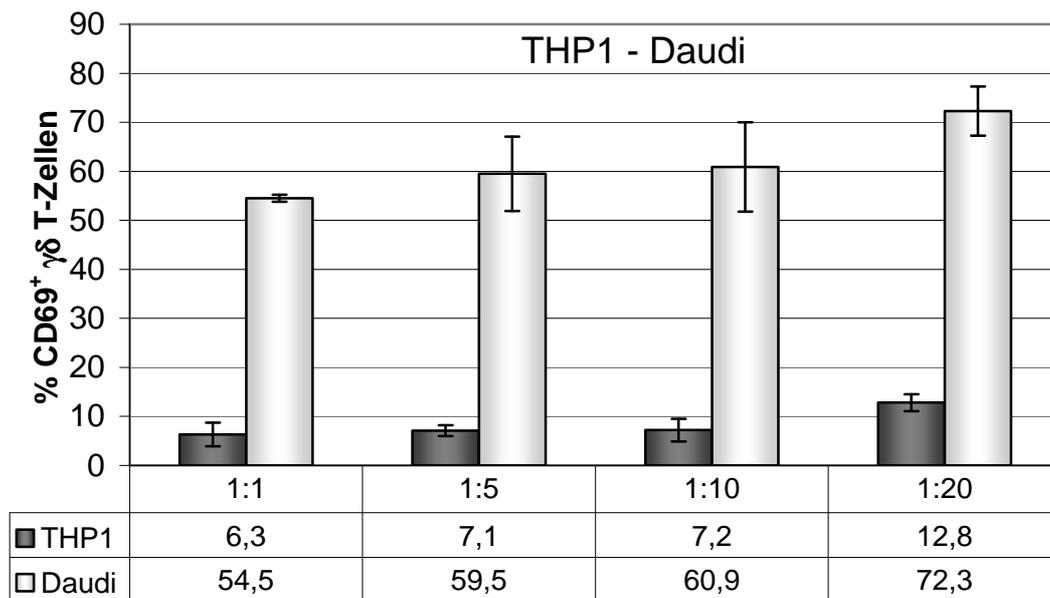


Abbildung 4: Prozentualer Anteil CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen unter den peripheren Blutlymphozyten des Normalspenders A nach 12-stündiger Inkubation mit der Zelllinie THP1 (akute monozytäre Leukämie) und der Zelllinie Daudi (Burkitt Lymphom). Die Tumorzelllinien wurden im Verhältnis zu PBL in einer bis zu 20-fach höheren Konzentration in Dreifachbestimmungen untersucht und als Mittelwert mit Standardabweichung aufgetragen.

4.2.2. Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Patienten-Tumorzellen

Die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen der beiden gesunden Spender wurde nach 12-stündiger Inkubation mit Tumorzellen verschiedener Patienten untersucht. Die Tumorzellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus venösem Vollblut der Patienten gewonnen und anschließend durch magnetische Zellseparation isoliert. Die Effizienz der Positivselektion von Tumorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die angereicherten Tumorzellen wurden entweder direkt oder nach zwischenzeitlicher Kryokonservierung für die Experimente verwendet.

Dem Ansatz in 4.2.1 entsprechend wurden PBL des Normalspenders B und Tumorzellen des Patienten 1 (sek. AML nach MDS, Subtyp M4, siehe Tab. 1) in den Verhältnissen (PBL : AML) 1:1, 1:4, 1:10 und 1:40 untersucht. Die Tumorzellen wurden durch die magnetische Zellseparation auf 97 % Blastenzellen angereichert. Der Anteil der patienteneigenen $\gamma\delta$ T-Zellen in der

Tumorzellfraktion war nach der Zellseparation mit < 0,1 % aller Patientenzellen vernachlässigbar gering.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumorzellen nach Anreicherung
1	61J, w	Sek. AML M4 nach MDS	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	97%

Tabelle 1: Charakteristik der verwendeten Tumorzellen und deren prozentualer Anteil an den Patientenzellen nach Anreicherung durch magnetische Zellseparation. Die Einteilung der akuten myeloischen Leukämien erfolgte nach der FAB-Klassifikation.

Abbildung 5 stellt die durchflusszytometrische Messung der Negativkontrolle (PBL alleine) mit der Inkubation von PBL-AML (Patient 1) in dem Verhältnis 1:40 gegenüber. Eine deutliche Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen – zusammen mit einer Herabregulation des $\gamma\delta$ -TZR – durch die Tumorzellen des Patienten 1 ist als Fraktion im rechten oberen Quadranten ersichtlich.

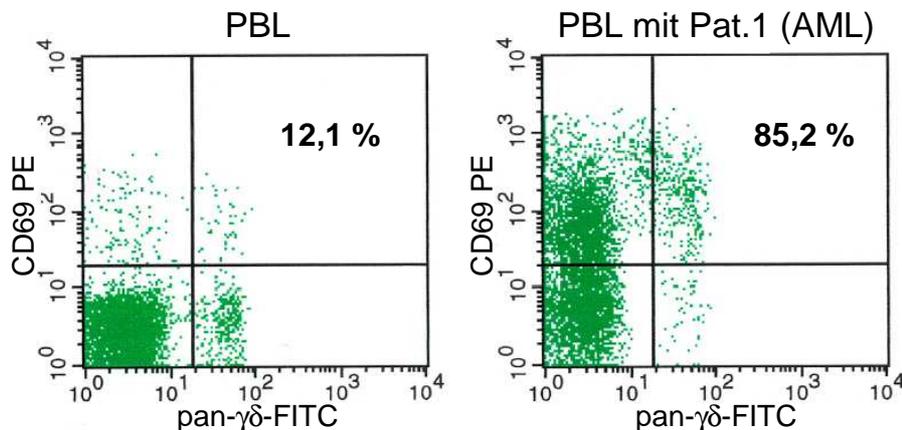


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung der CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen nach Inkubation von PBL alleine (linke Abbildung) und nach Inkubation von PBL mit AML-Blasten des Patienten 1 in einem Verhältnis von 1:40 (rechte Abbildung). Die angegebenen Werte beziehen die CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen als Doppelfluoreszenz im rechten oberen Quadranten auf alle $\gamma\delta$ T-Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten.

Dabei kam es mit ansteigender Tumorzellzahl auch zu einer zunehmenden Stimulierung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten des Spenders B (Abb. 6). Im Versuchsansatz wurden auch PBL alleine und PBL mit BrHPP mitgeführt. Im Vergleich zu BrHPP führen die AML-Blastenzellen des Patienten 1 zu einer überaus starken CD69-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen als Zeichen ihrer Aktivierung.

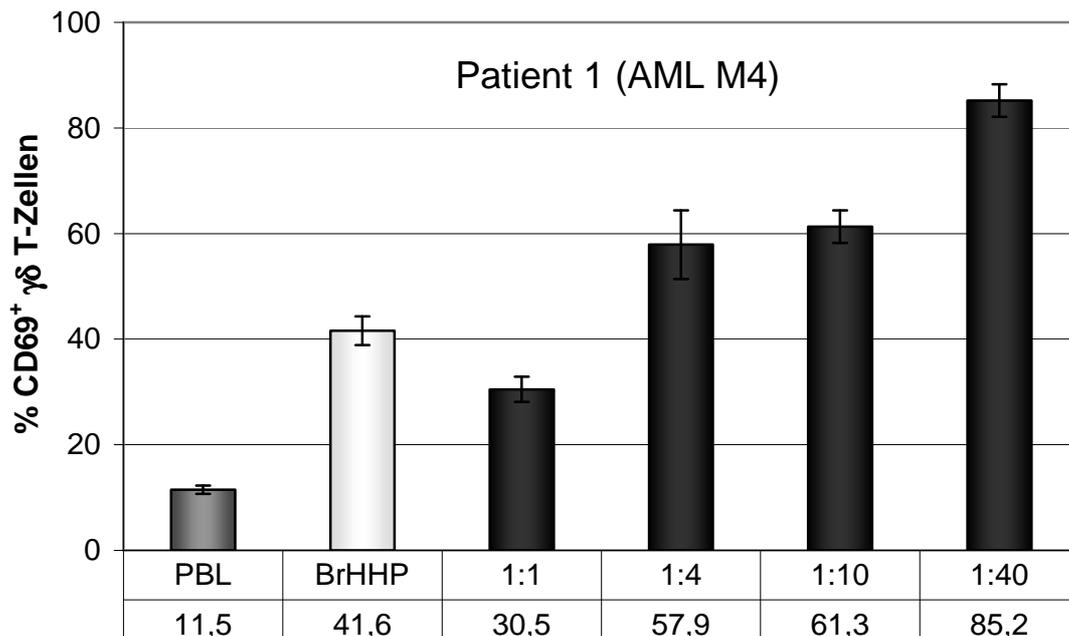


Abbildung 6: Prozentualer Anteil CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen unter den peripheren Blutlymphozyten des Normalspenders B nach 12-stündiger Inkubation mit den Blastenzellen des Patienten 1 (AML M4) im Vergleich mit den PBL alleine und mit BrHPP stimulierten PBL. Die Werte wurden als Mittelwert aus Dreifachbestimmungen angegeben und mit Standardabweichung aufgetragen.

Auch die Gegenüberstellung der $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation des Normalspenders B mit einer PBL-THP1-Inkubation als Negativkontrolle und einer PBL-Daudi-Inkubation als Positivkontrolle verdeutlicht das hohe Aktivierungspotential der Tumorzellen dieses Patienten (Abb. 7). Die Werte mit THP1 bzw. Daudi sind gemittelte Werte aus anderen Versuchen des Normalspenders B und können somit nur indirekt verglichen werden.

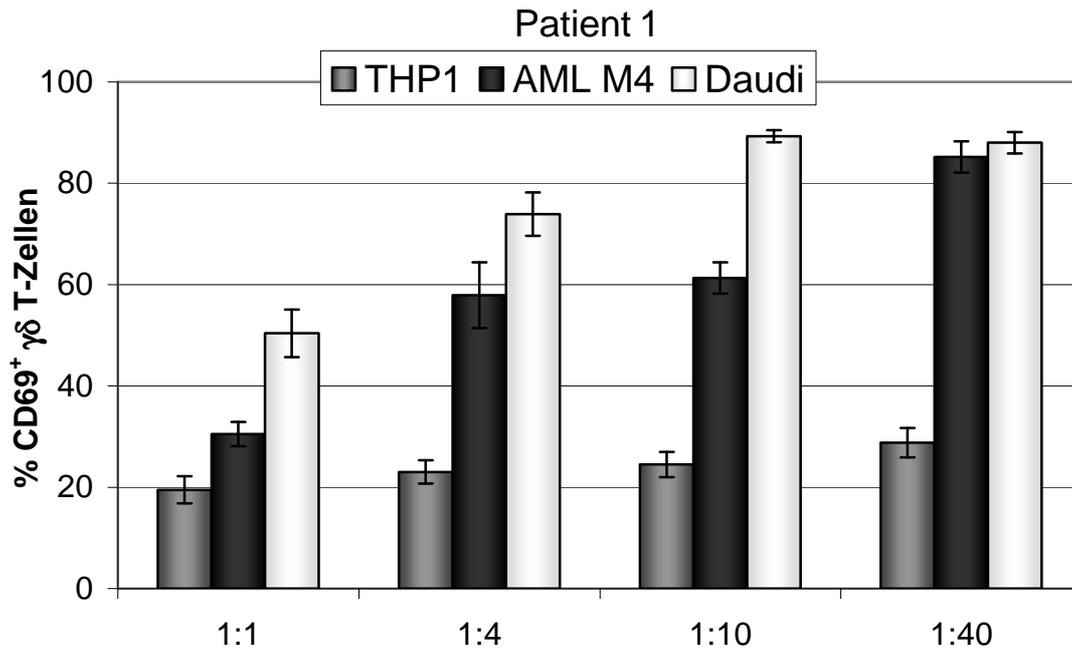


Abbildung 7: Gegenüberstellung der $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung durch die blastären Zellen der AML M4 (Patient 1), durch THP1 als Negativkontrolle und durch Daudi als Positivkontrolle. THP1 bzw. Daudi sind als gemittelte Werte aus anderen Versuchen mit Standardabweichung aufgetragen.

Als zusätzliche Negativkontrolle wurden in diesem Versuch und in den Folgeversuchen auch Blastenzellen alleine inkubiert. Nach 12-stündiger Inkubation beinhalteten diese auch in 40-fach höherer Zellzahl im Vergleich zu den PBL des Spenders weiterhin nur einen vernachlässigbar kleinen Anteil an patienteneigenen $\gamma\delta$ T-Zellen, weshalb diese Werte in diesem und auch in den Folgeexperimenten nicht aufgeführt wurden.

Zusammenfassend wurde mit diesem Versuch die deutliche in vitro Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen des Spenders B durch die Tumorzellen des Patienten 1 (AML M4) nachgewiesen.

Entsprechend dem vorherigen Experiment wurde Spender B zusammen mit Patient 2 untersucht (AML M2, Tab. 2). Im Vergleich zur CD69-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Ansatz mit PBL alleine, sowie mit PBL in Gegenwart von BrHPP führte auch eine maximale Tumorzellzahl von 1:20 zu keiner relevanten Stimulierung (Abb. 8). Eine Wiederholung dieses Versuches bestätigte dieses Ergebnis.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumorzellen nach Anreicherung
2	52J, m	AML M2	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	95,6%

Tabelle 2: Charakteristik der in diesem Versuch verwendeten Patientenzellen

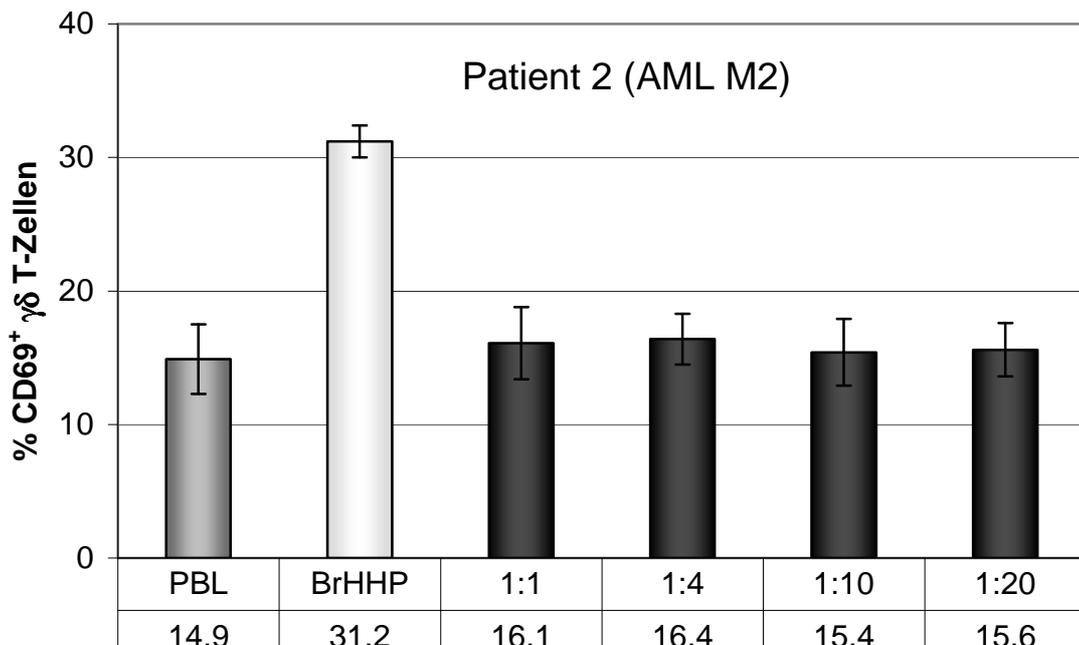


Abbildung 8: Auch in Gegenwart einer 20-fach höheren Tumorzellzahl (AML M2) kam es im Vergleich mit PBL alleine und mit BrHPP stimulierten PBL zu keiner wesentlichen CD69 Expression als Zeichen fehlender $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung.

Mit Patient 3 lagen erneut Tumorzellen einer akuten myeloischen Leukämie vor (AML M4, Tab. 3). In diesem Ansatz wurden ebenfalls native PBL des Spenders B und BrHPP inkubierte PBL mitgeführt. In Gegenwart der Blastenzellen konnte eine leichte erhöhte CD69 Expression der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gemessen werden (Abb. 9). Mit zunehmender Tumorzellzahl war dabei kein weiterer Anstieg der Aktivierung zu erkennen.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumorzellen nach Anreicherung
3	49J, m	AML M4	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	97,7%

Tabelle 3: Tumorzellen des Patienten 3 mit der Diagnose einer AML M4

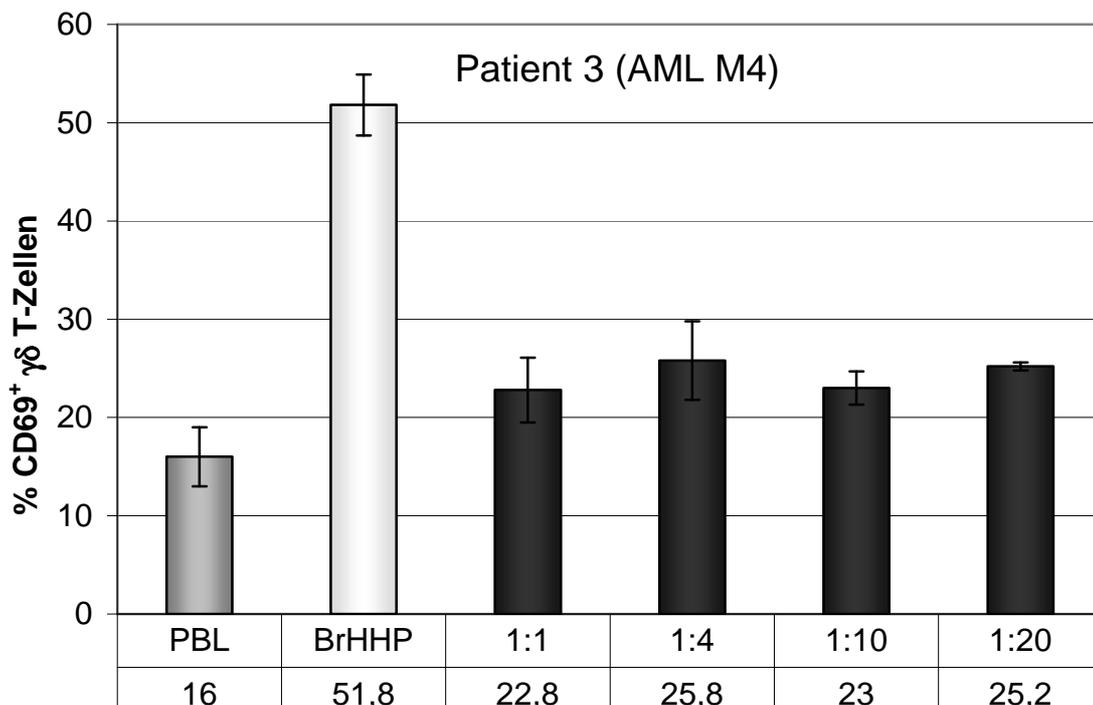


Abbildung 9: Leicht erhöhter Anteil CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in der Inkubation der PBL mit den Blastenzellen des Patient 3 gegenüber PBL alleine.

Im Vergleich dieser Werte mit einer PBL-THP1 als Negativkontrolle und mit PBL-Daudi als Positivkontrolle zeigten die Tumorzellen kein höheres Aktivierungspotential als die Negativkontrolle THP1 (Abb. 10). Auch wenn die Werte von THP1 und Daudi aus zeitlich versetzten Versuchen stammten ist in diesem Fall von einer eher unspezifischen Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Tumorzellen des Patienten 3 auszugehen.

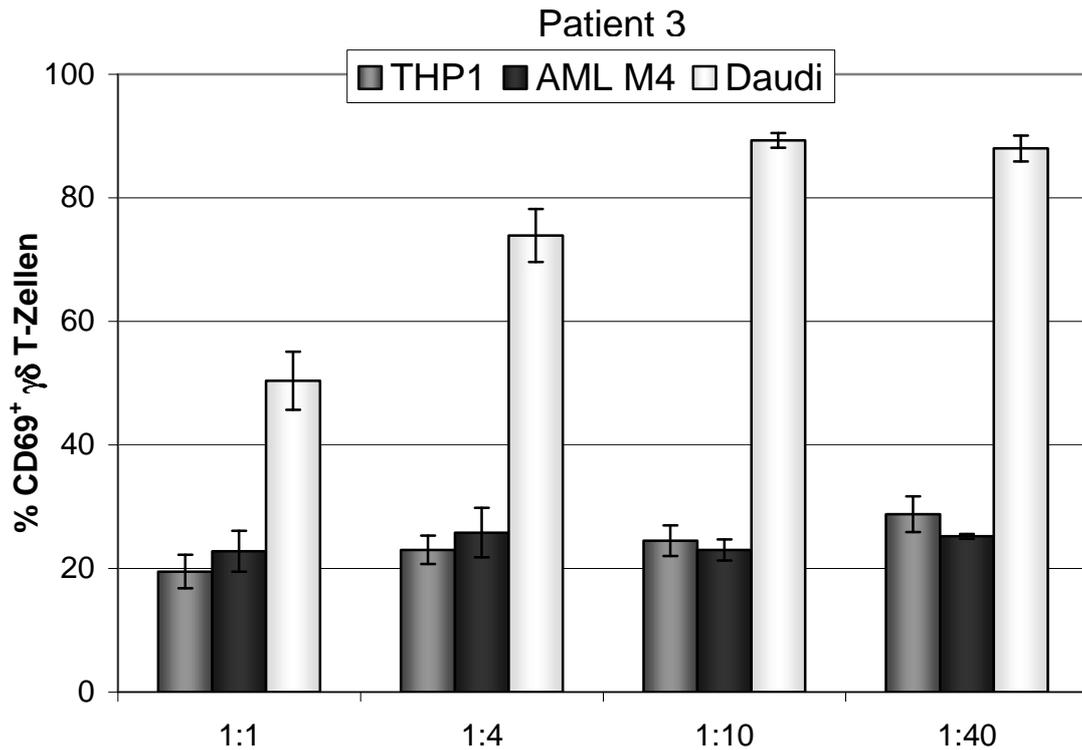


Abbildung 10: Gegenüberstellung der $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung des Normalspenders B durch die blastären Zellen der AML M4 (Patient 3), durch THP1 als Negativkontrolle und durch Daudi als Positivkontrolle

PBL des Normalspenders A wurden in einem entsprechenden Ansatz mit Tumorzellen des Patienten 4 (AML M4/M5, Tab. 4) untersucht. Analog zu der Schlussfolgerung zu Patient 3 muss die mit der Tumorzellzahl steigende Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 11) in einer Gegenüberstellung mit THP1 bzw. Daudi aus anderen Versuchen relativiert werden. Insgesamt ist von einer fehlenden oder nur schwachen Aktivierung der $\gamma\delta$ -Zellen durch die Tumorzellen des Patienten 4 auszugehen.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumorzellen nach Anreicherung
4	68J, w	AML M4/M5	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	99,7%

Tabelle 4: Eigenschaften der Tumorzellen von Patient 4

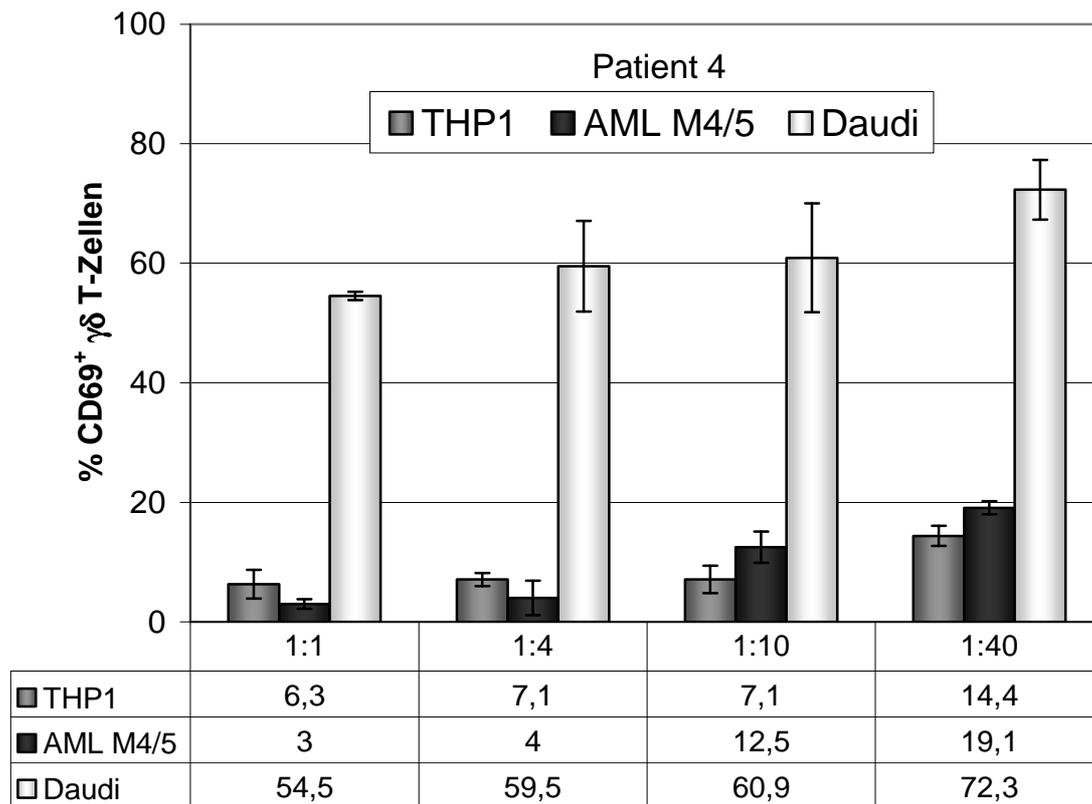


Abbildung 11: Im Vergleich zur PBL-THP1-Inkubation (Negativkontrolle) kommt es bei der PBL-AML-Inkubation (Patient 4) nur zu einer gering höheren maximalen CD69 Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen (PBL Spender A).

Ein weiterer Versuch erfolgte mit Blastenzellen einer akuten lymphatischen Leukämie (Patient 7, Tab. 5). Unter den gemessenen CD 69⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen der PBL-ALL-Inkubation stammte vor allem bei 20-fach höherer Tumorzellzahl ein erheblicher Anteil positiver Zellen aus dem Tumorzellgemisch selbst. Dies ging aus der Inkubation der Tumorzellen alleine als zusätzliche Negativkontrolle hervor, die aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen enthielt. Nach Abzug dieser Zellen hätte der maximale Wert für die $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation durch die Blasten der ALL deutlich unter 10 % gelegen. Somit sollte als Schlussfolgerung für die Tumorzellen von Patient 7 kein $\gamma\delta$ -aktivierendes Potential angenommen werden (Abb. 12).

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumorzellen nach Anreicherung
7	22J, m	Prae-B-ALL	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 34 ⁺	96,1%

Tabelle 5: Patient 7 mit der Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie

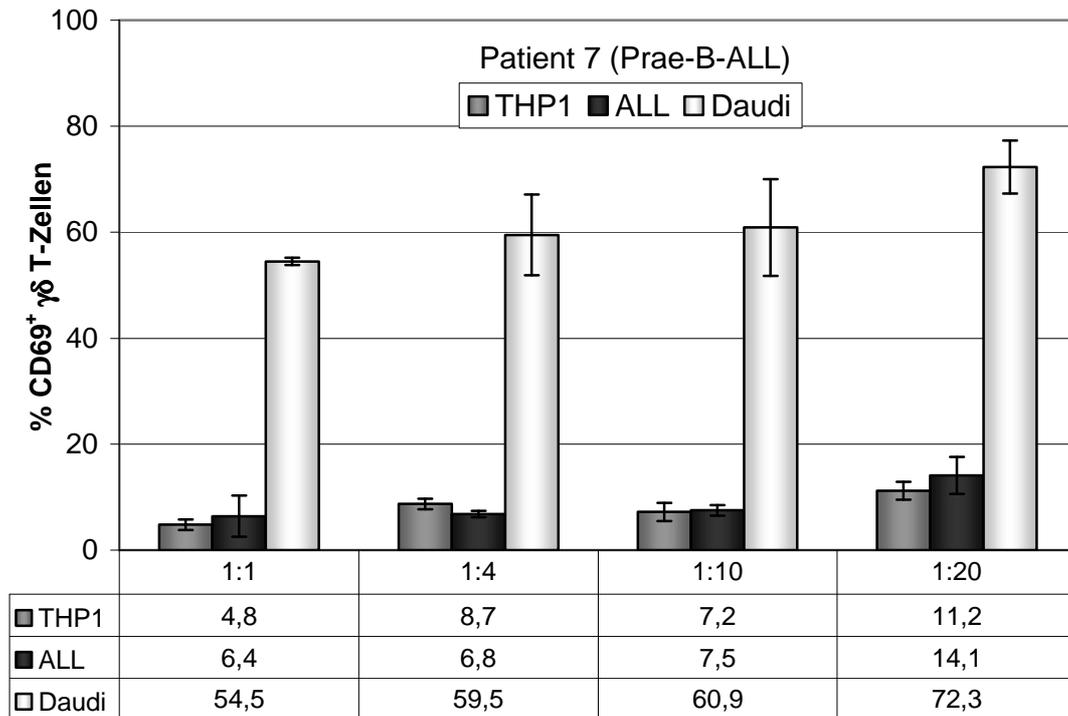


Abbildung 12: Ein wesentlicher Anteil der 14,1 % CD69⁺ γδ T-Zellen bei 20-facher Tumorzellzahl stammte – wie in einer hier nicht aufgeführten Kontrolle festgestellt wurde – von patienteneigenen γδ T-Zellen aus der Tumorzellfraktion. Die Aktivierung der γδ T-Zellen des Normalspenders hätte ohne diese deutlich unter 10 % gelegen. Für die ALL des Patienten 7 ist somit von keinem γδ aktivierenden Potential auszugehen.

Im folgenden Experiment wurden Zellen einer chronischen lymphatischen Leukämie (Patient 10, Tab. 6) zusammen mit PBL des Spenders A analysiert. Der Anteil CD69-positiver γδ T-Zellen betrug unter den PBL alleine 2,5 %. Bei einem Verhältnis PBL : B-CLL von 1:40 stieg die Stimulation mit 23,2 % auf über das 9-fache gegenüber den PBL alleine. Eine Auftragung dieser Werte mit THP1 und Daudi aus zeitversetzten Experimenten ließ jedoch nur eine auf das 1,6-fache der Negativkontrolle (THP1) steigende Aktivierung erkennen (Abb. 13). Zusammenfassend lag allenfalls eine schwache Aktivierung der γδ T-Zellen durch die CLL-Zellen vor.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumorzellen nach Anreicherung
10	78J, w	B-CLL	CD5 ⁺ , 10 ⁻ , 19 ⁺ , 23 ⁻	97,4%

Tabelle 6: Von Patient 10 verwendete Zellen einer chronisch lymphatischen Leukämie

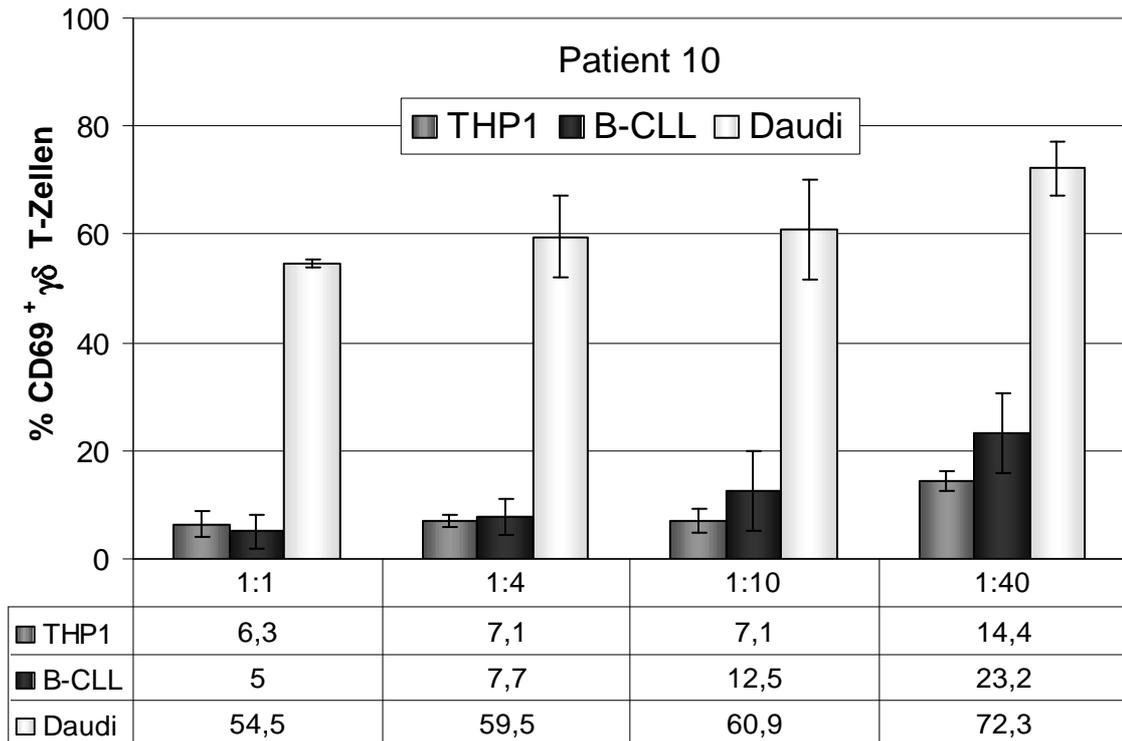


Abbildung 13: Mit 23,2 % CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Lymphozyten durch eine 40-fach höhere Lymphomzellzahl (Patient 10) lag im Vergleich zu 14,4 % durch die Negativkontrolle THP1 ein 1,6-fach höherer Wert vor.

4.3 Anti-Tumoraktivität von BrHPP-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen

Aufgrund der bekannten Anti-Tumor Effekte von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber gewissen Tumorzellen wurde der Untersuchung der Aktivierung folgend das lytische Potential von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gegenüber Zelllinien und Patienten-Tumorzellen in vitro analysiert. Zur Quantifizierung von Zelllyse und Zelltod diente ein Zytotoxizitätstest basierend auf der Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität.

Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten – als Effektorzellen – des Normalspenders A bzw. B wurden über 12 bis 16 Tage mit BrHPP und IL-2 angereichert und stimuliert (entsprechend dem Ansatz im Kapitel 4.1. des Ergebnisteils). Unmittelbar vor dem Ansatz wurden tote Targetzellen (Tumorzellen, Daudi, THP1) und tote Effektorzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt. Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wurden auf $2,5 \times 10^5$, 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$ und 5×10^3 Zellen/Well titriert, um mit den Targetzellen (5×10^3 Zellen/Well) in einem Verhältnis (Effektor : Target) von 50:1, 10:1, 5:1, 1:1 inkubiert zu werden. Alle Werte wurden nach 4 Stunden in Dreifachbestimmungen gemessen. Die Menge toter Zellen oder Zellen mit Plasmamembran-Schädigung geht mit einem Anstieg der LDH-Enzymaktivität einher. Ein ausreichend großes Intervall zwischen spontaner LDH-Freisetzung und maximaler LDH-Freisetzung (mittels Triton X 100) der Targetzellen war für die Bestimmung der Zytotoxizität Voraussetzung. Diese Werte wurden bei der Beschreibung der Targetzellen mitaufgeführt. Durch eine Reaktionsmischung kann der Anstieg der LDH-Enzymaktivität mit einer Farbentwicklung innerhalb einer gewissen Zeitspanne korreliert werden, wobei die Stärke der Farbentwicklung proportional die Zahl der lysierten Zellen widerspiegelt. Mit Hilfe eines ELISA-Readers erfolgte eine spektrophotometrische Messung und daraus konnte die prozentuale Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den Tumorzellen berechnet werden.

4.3.1. Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Zelllinien

In den ersten Versuchen wurden nach diesem Ansatz BrHPP-stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen des Normalspenders A zusammen mit der Tumorzelllinie THP1 (akute monozytäre Leukämie) und der Tumorzelllinie Daudi (Burkitt Lymphom) untersucht.

Konsistent in allen durchgeführten Experimenten zeigten die BrHPP-stimulierten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten keine lytische Aktivität gegenüber THP1. Die Abbildung 14 veranschaulicht dies bis hin zum maximalen Effektor : Target-Verhältnis von 50:1. Nach Inkubation mit Daudi-Zellen fand sich hingegen in allen dementsprechend durchgeführten Experimenten eine deutliche Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen. Mit steigender Effektorzellzahl ($\gamma\delta$ T-Zellzahl) kam es dabei zu einer zunehmenden Lyse der Tumorzellen (Abb. 14).

Aus der Gegenüberstellung der beiden Targetzellen wird ersichtlich, dass zur Untersuchung der Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen die AML-Zelllinie THP1 als verlässliche Negativkontrolle und die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi als verlässliche Positivkontrolle verwendet werden konnten.

Zelllinie	Abstammung	Immunphänotyp	LDH-Freisetzung min./max.
THP1	Akute monozytäre Leukämie	CD13 ⁺ , 33 ⁻ , 34 ⁺ HLA-Kl. I ⁺	0,053 / 0,544
Daudi	Burkitt Lymphom	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 34 ⁻ , HLA-Kl. I ⁻	0,160 / 0,591

Tabelle 7: Eigenschaften der als Negativ- und Positivkontrolle verwendeten Tumorzelllinien mit Angabe der spontanen und maximalen (mittels Triton X 100) LDH-Freisetzung im Zytotoxizitätsassay. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus allen Versuchen.

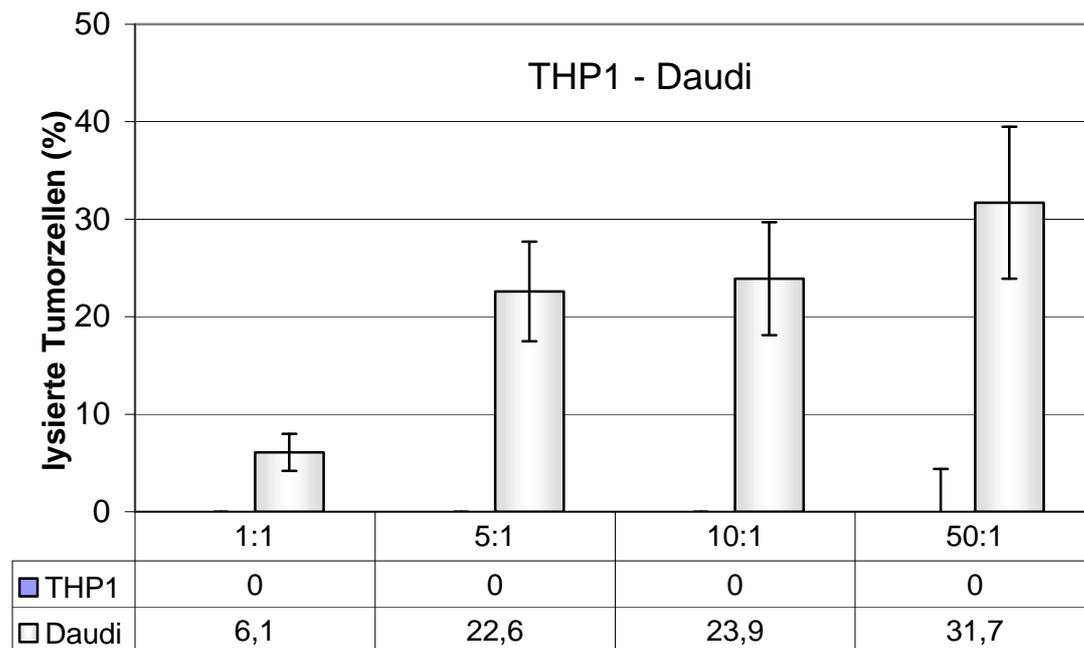


Abbildung 14: BrHPP stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen des Normalspenders A zeigten keine lytische Aktivität gegenüber der Zelllinie THP1, die sich daher als gute Negativkontrolle eignet. Die Zelllinie Daudi ist hingegen sehr empfindlich gegen die lytische Aktivität und stellt eine gute Positivkontrolle dar. Die Werte stammen aus 11 verschiedenen Experimenten mit THP1 und aus 5 Experimenten mit Daudi, in denen jeweils der Mittelwert aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung bestimmt wurde.

Diese Resultate ließen sich auch in Experimenten mit den $\gamma\delta$ T-Zellen des Normalspenders B bestätigen. Gegenüber THP1 fanden sich lediglich bei einem Effektor : Target-Verhältnis von 50:1 Werte im Bereich einer schwachen lytischen Aktivität. Aus Abbildung 15 geht die deutliche Zytotoxizität des Spenders B gegen Daudi als Mittelwert aus 2 Versuchen hervor. Die Ergebnisse mit THP1 entsprechen Mittelwerten aus 6 Experimenten in denen jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden.

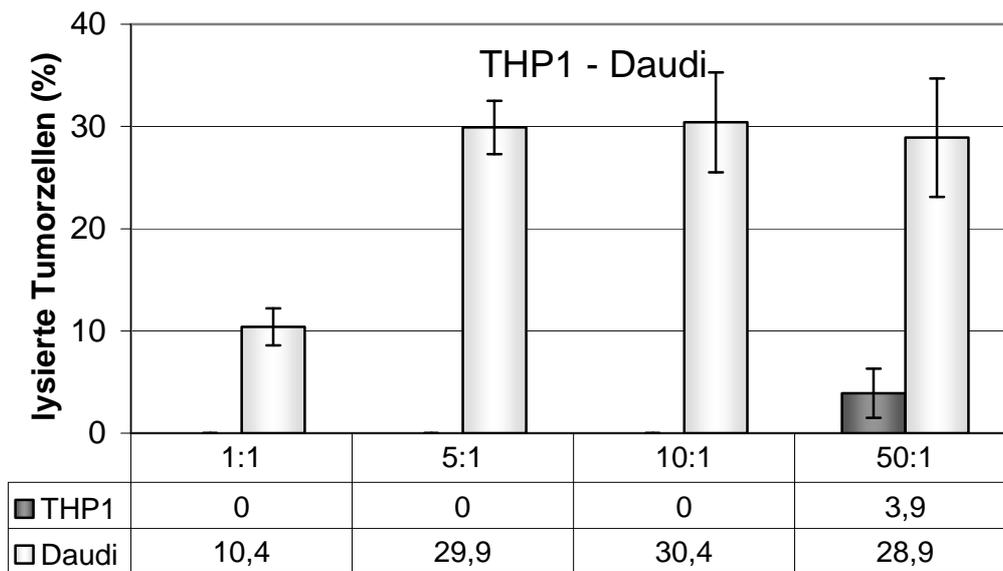


Abbildung 15: Zytotoxizität der aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen des Normalspenders B gegenüber THP1 als Negativkontrolle und Daudi als Positivkontrolle als gemittelte Werte aus verschiedenen Experimenten mit Standardabweichung

Die Zelllinie U-226 entstammt aus Tumorzellen eines Multiplen Myeloms (Plasmozytom). In einem Ansatz mit $\gamma\delta$ T-Zellen des Spenders A zeigte sie sich als empfindliches Target. Aus Abbildung 16 ist die mit der Effektorzellzahl zunehmende Zytotoxizität gegenüber U-226 ersichtlich.

Zelllinie	Abstammung	Immunphänotyp	LDH-Freisetzung min./max.
U-226	Multiplenes Myelom	CD33 ⁻ , 38 ⁺ , 138 ⁺ , IgE λ , HLA-Kl. I ⁺	0,041 / 0,418

Tabelle 8: Eigenschaften der für das Zytotoxizitätsassay verwendeten Zelllinie U-226 mit Angabe der spontanen und maximalen LDH-Freisetzung

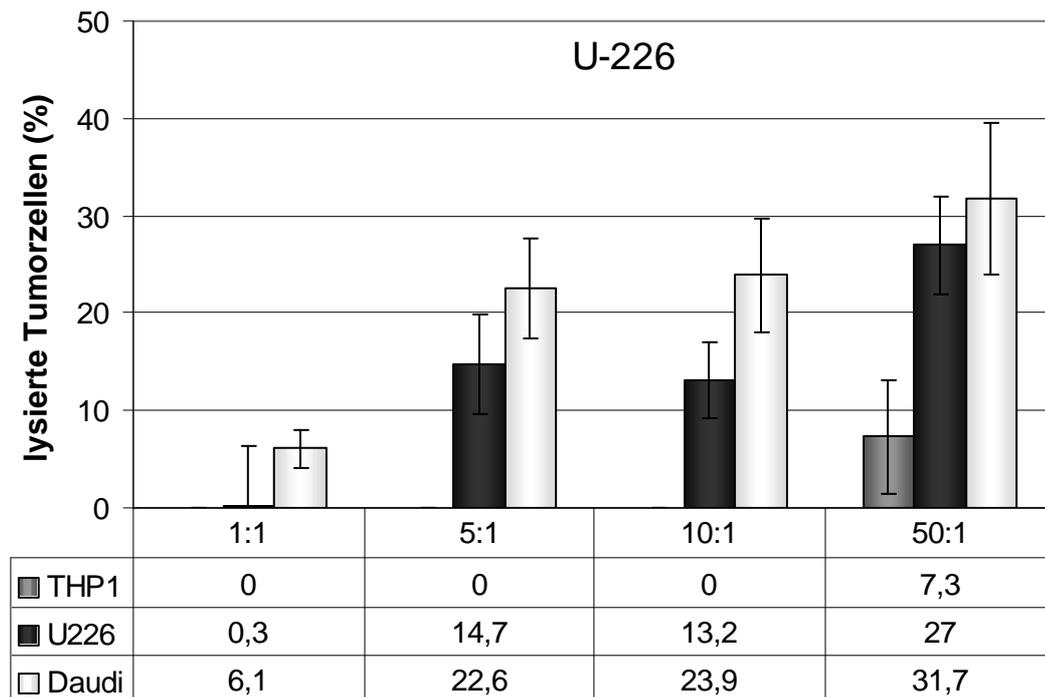


Abbildung 16: In 50-fach höherer $\gamma\delta$ T-Zellzahl wurden 27 % der U-226 Zellen lysiert, die damit ein empfindliches Target darstellten.

4.3.2. Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Patienten-Tumorzellen

Für das erste Experiment mit patienteneigenen Tumorzellen wurden PBL des gesunden Spenders B über 13 Tage mit BrHPP expandiert und aktiviert. Der Anteil der $\gamma\delta$ -Zellen betrug danach 81,3 % aller T-Zellen und davon waren 28 % aktiviert (CD69⁺). Die Targetzellen von Patient 1 (Tab. 9) wurden durch magnetische Zellseparation auf 97 % Blastenzellen angereichert.

Für die $\gamma\delta$ T-Zellen konnte dabei ein deutliches, mit der Effektorzellzahl ansteigendes zytotoxisches Potential gegenüber den Leukämiezellen nachgewiesen werden. Dies bestätigte sich auch in einem Wiederholungsversuch. Die Mittelwerte aus beiden Experimenten sind in Abbildung 17 aufgetragen.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ / T-Zellen Spender B
1	61J, w	Sek. AML M4 nach MDS	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁻ , HLA-Kl. I ⁺	97%	0,008 / 0,160	81,3%

Tabelle 9: Charakteristik der Targetzellen (Patient 1) mit Anteil der Tumorzellen nach magnetischer Zellseparation und deren spontane und maximale LDH-Freisetzung. Expansion der Effektorzellen (Normalspender B) mit Angabe der $\gamma\delta$ T-Zellen bezogen auf alle T-Zellen nach Inkubation mit BrHPP über 13 Tage.

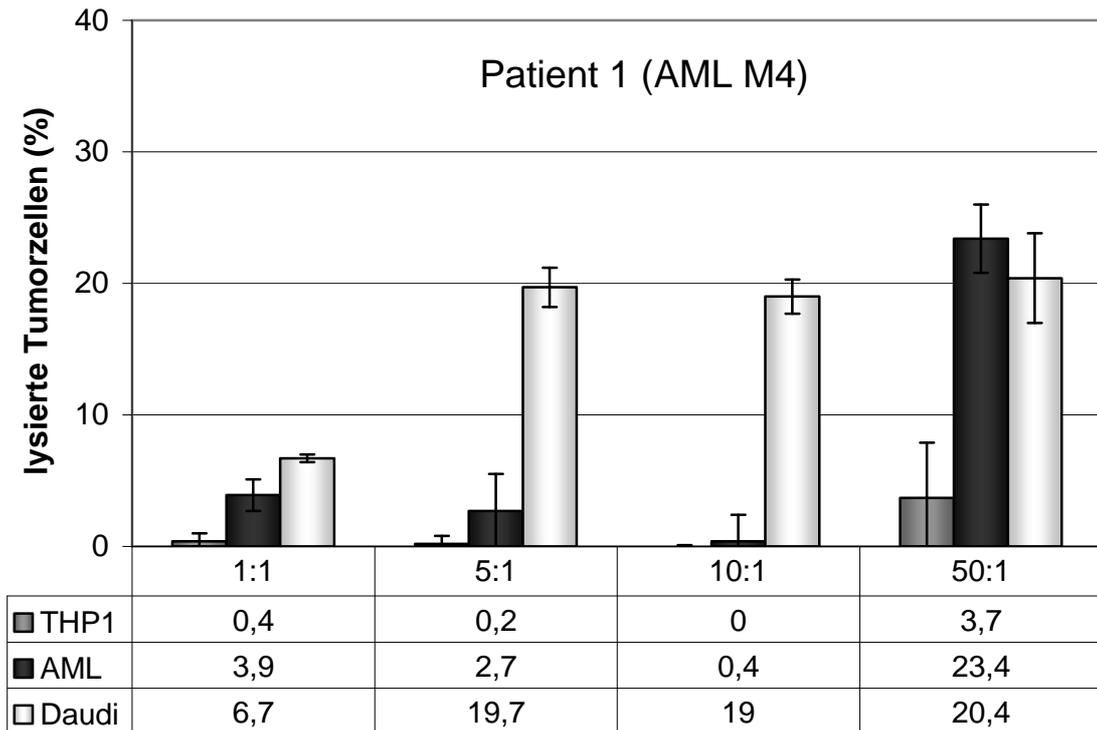


Abbildung 17: Die BrHPP stimulierten Effektorzellen ($\gamma\delta$ T-Zellen) bildeten in 50-fach höherer Zellzahl ein deutliches zytotoxisches Potential gegenüber den Targetzellen (AML M4) des Patienten 1 aus. THP1 und Daudi dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

Die Tumorzellen des Patient 2 (AML M2, Tab. 10) konnten durch magnetische Zellseparation auf 95,6 % der Patientenzellen konzentriert werden. Der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen betrug nach Expansion über 16 Tage 84 % der Effektorzellen, von denen 29,7 % stimuliert (CD69⁺) waren.

Nach Durchführung des Standardansatzes wurden bei einem Effektor : Target-Verhältnis von 50:1 bis zu 23,7 % lysierte AML-Blasten gemessen (Abb. 18). Somit übten die aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen des Spenders eine deutliche, mit

steigender Effektorzellzahl zunehmende Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen von Patient 2 aus.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ /T-Zellen Spender B
2	52J, w	AML M2	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	95,6%	0,002 / 0,116	84%

Tabelle 10: Charakteristik der Target- und Effektorzellen

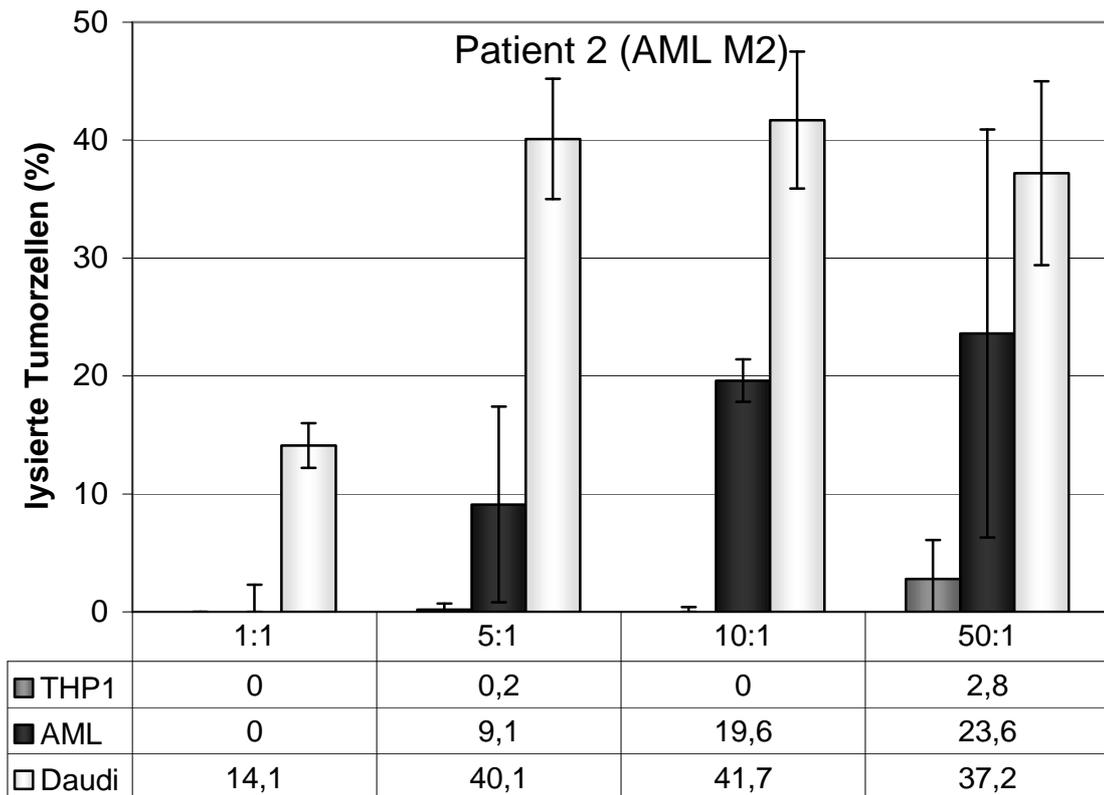


Abbildung 18: Mit steigender Effektorzellzahl zunehmende Lyse der AML-Blasten (Patient 2). Die Standardabweichung erreichte dabei teils hohe Werte.

Die Diagnose von Patient 3 war eine AML M4 (Tab. 11) und 97,7 % aller Targetzellen waren nach Anreicherung Blastenzellen. Die Effektorzellen wurden über 18 Tage auf 75,4 % $\gamma\delta^+$ T-Zellen angereichert. In diesem Experiment fand sich ab einem Effektor-Target-Verhältnis von 5:1 eine schwach beginnende lytische Aktivität, die mit steigender Effektorzellzahl deutlich anstieg und nahezu die Größenordnung der Positivkontrolle erreichte (Abb. 19). Trotz der in diesem

Versuch hoch ausfallenden Standardabweichung ist die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gegenüber der AML des Patienten 3 deutlich zu erkennen.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ /T-Zellen Spender B
3	49J, m	AML M4	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	97,7%	0,013 / 0,093	75,4%

Tabelle 11: Eigenschaften der verwendeten Target- und Effektorzellen

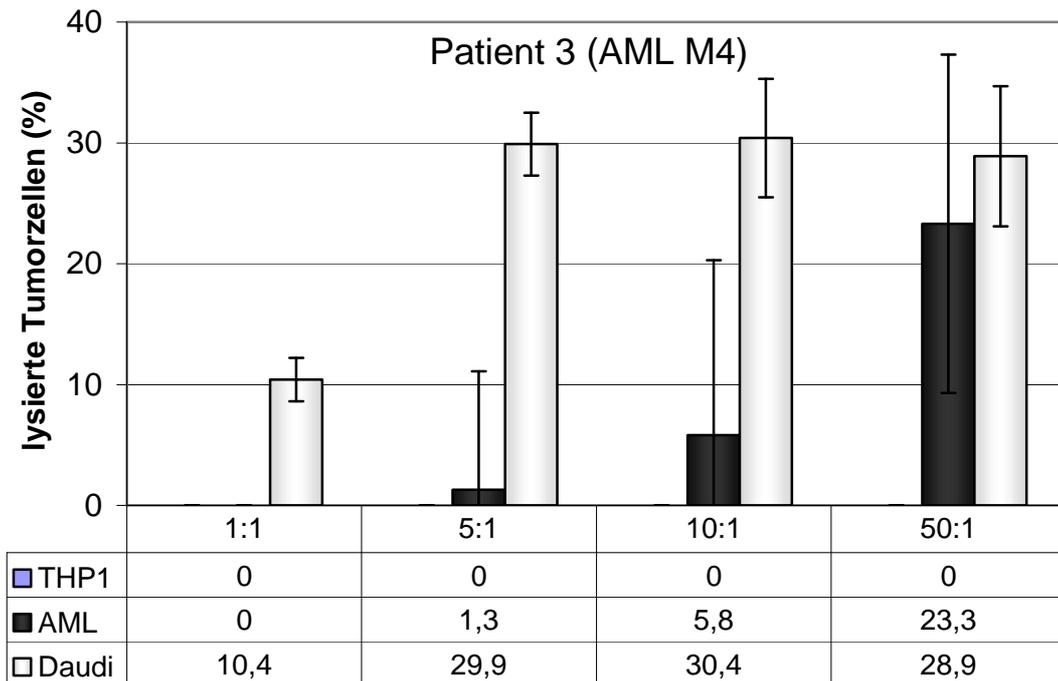


Abbildung 19: Trotz der großen Standardabweichung der gemessenen Werte stellte die AML M4 (Patient 3) ein $\gamma\delta$ T-Zell-empfindliches Target dar.

Die Zytotoxizitätstestungen umfassten eine weitere akute myeloische Leukämie (Patient 4, Tab. 12). Durch die Anreicherungsverfahren waren 89,4 % der Targetzellen CD33-positiv und 89,7 % der T-Lymphozyten $\gamma\delta$ -positiv.

Lediglich bei maximaler Effektorzellzahl bildete sich eine leichte lytische Aktivität gegenüber der AML M4/M5 aus. Die Standardabweichung reichte dabei von einem Bereich fehlender Zytotoxizität bis über die Positivkontrolle hinaus (Abb. 20).

Dieser Versuch unterlag allerdings einer methodischen Einschränkung. Der Zytotoxizitätstest, basierend auf der Messung der Laktatdehydrogenase-

Aktivität, ist auf ein deutliches Intervall zwischen spontaner und maximaler LDH-Freisetzung der Targetzellen angewiesen. Im Vergleich mit den vorherigen Experimenten lag bei Patient 4 eine bereits hohe spontane LDH-Freisetzung vor. Der maximale Wert war nur knapp das 5-Fache des minimalen Wertes und damit in Relation deutlich kleiner als in den vorherigen Versuchen mit Patienten-Tumorzellen. Bereits Veränderungen im Tausendstel-Bereich der mit dem ELISA-Reader gemessenen Werte führten in der mathematischen Gleichung zur Berechnung der Zytotoxizität zu einer deutlichen Veränderung. Des weiteren befanden sich die verwendeten Targetzellen dieses Patienten schon ungewöhnlich lange (> 10 Jahre) in Kryokonservierung.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ / T-Zellen Spender A
4	68J, w	AML M4/M5	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	99,7%	0,036 / 0,176	89,7%

Tabelle 12: Entgegen den vorherigen Versuchen lag bei Patient 4 bereits eine hohe spontane LDH-Freisetzung der Targetzellen vor, was eine methodische Einschränkung für die Berechnung der Zytotoxizität bedeutete.

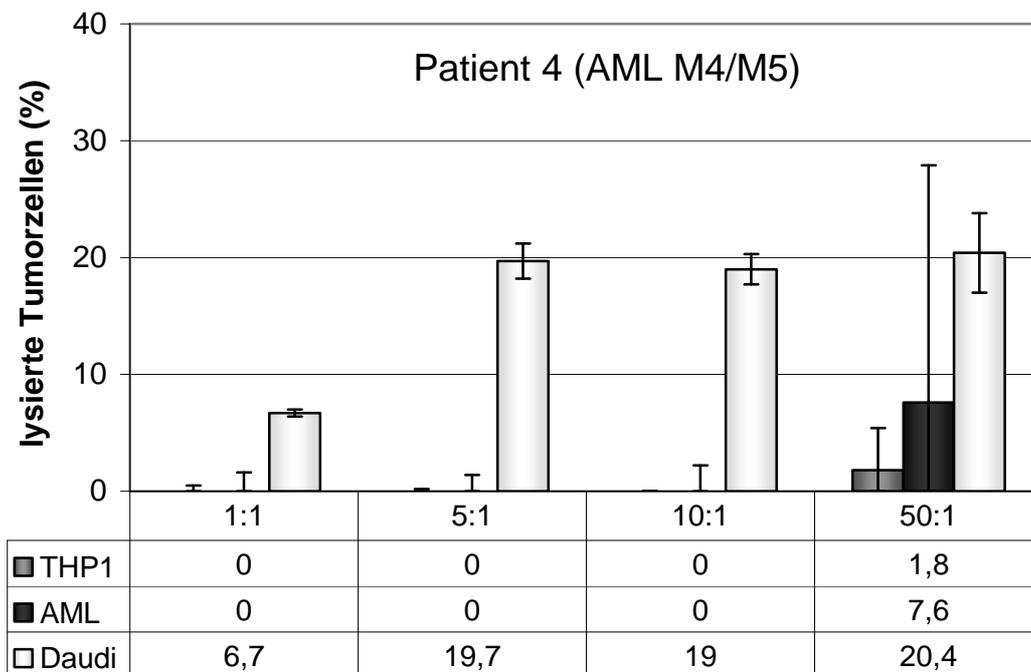


Abbildung 20: Die Dreifachbestimmung der Zytotoxizität für eine Effektor-Target-Verhältnis von 50:1 zeigte eine erhebliche Standardabweichung (Patient 4).

Das Problem eines sehr kleinen Intervalls zwischen spontaner und maximaler LDH-Freisetzung (LDH min./max.: 0,005 – 0,018) fand sich zudem noch ausgeprägter in einem anderen Versuch mit Targetzellen eines Mantelzelllymphoms (Patient 10, Tab. 5), wodurch eine Auswertung unmöglich wurde.

Für das letzte Experiment mit einer AML wurde der Ansatz des Zytotoxizitätsassays noch um ein weiteres Target erweitert. Neben der in der magnetischen Zellseparation gewonnenen Positivfraktion mit den Tumorzellen wurde auch die übrig gebliebene nahezu Tumorzell-negative Fraktion als Target verwendet. Auch die Effizienz dieser zweiten Selektion wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Für Patient 5 (Tab. 13) mit der Diagnose einer sekundären akuten myeloischen Leukämie nach MDS fand sich gegenüber den 96,9 % in der Positivfraktion lediglich ein Anteil von 2 % Tumorzellen in der Negativfraktion.

Die $\gamma\delta$ T-Zellen des Normalspenders führten zu einer Zytotoxizität gegenüber der tumorzellreichen Positivfraktion. Lediglich für ein Verhältnis 10:1 konnte dies nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war keine wesentliche Lyse der tumorzellarmen Negativfraktion nachzuweisen (Abb. 21).

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ /T-Zellen Spender A
5	68J, m	Sek. AML M2 nach MDS	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	96,9%	0,019 / 0,097	85,5%

Tabelle 13: Mit Patient 5 wurde die insgesamt fünfte AML untersucht.

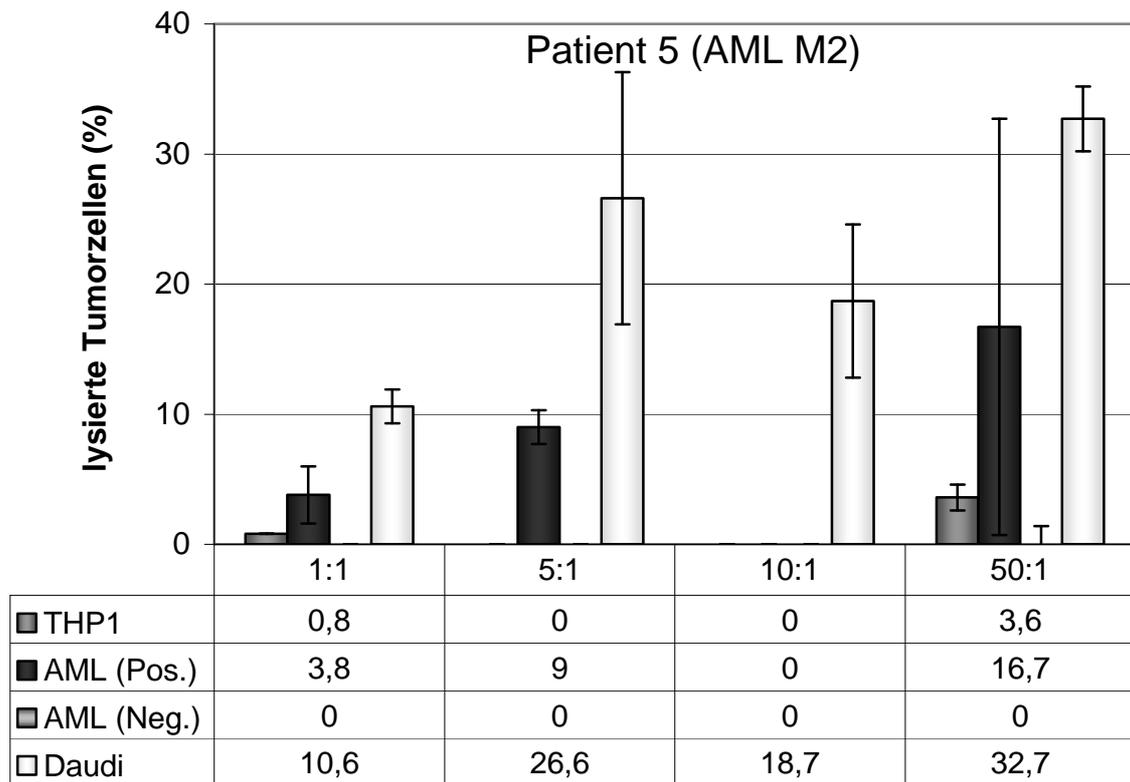


Abbildung 21: Neben der in der magnetischen Zellseparation gewonnenen AML-Positivfraktion (Pos.) mit den Tumorzellen wurde als weiteres Target auch die nahezu Tumorzell-negative Fraktion (Neg.) verwendet.

Nach Bestimmung der Zytotoxizität gegenüber 5 verschiedenen Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie wurden die Ergebnisse in Abbildung 22 miteinander verglichen. Die lytische Aktivität ist von dem Effektor : Target-Verhältnis abhängig und bildet sich bei einem Verhältnis von 50:1 am höchsten aus. Mit Einschränkung für Patient 4, dessen Tumorzellen eine hohe spontane LDH-Freisetzung hatten, waren alle der hier getesteten Leukämiezellen empfindlich gegenüber dem zytotoxischen Potential der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten.

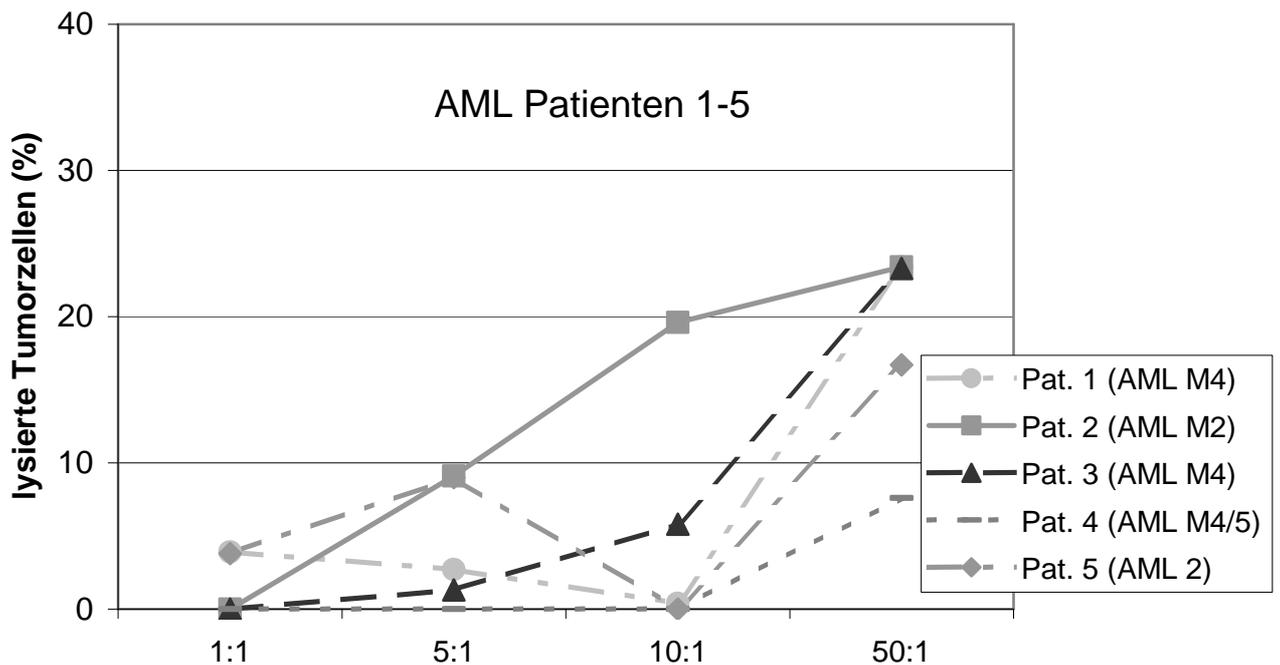


Abbildung 22: Alle Untersuchungen mit einer akuten myeloischen Leukämie (Patient 1 bis 5) hatten einen deutlichen Anteil lysierter Tumorzellen in Gegenwart der 50-fachen $\gamma\delta$ T-Zellzahl. Das Experiment mit der AML M4/M5 (Patient 4) bildete den niedrigsten Wert und unterlag einer methodischen Einschränkung. Die Werte sind ohne Standardabweichung aufgetragen.

Bei Patient 6 lag ein Rezidiv einer akuten lymphatischen Leukämie vor. Bei 50-facher Effektorzellzahl wurden bis zu 38,5 % der Tumorzellen lysiert (Tab. 14 und Abb. 23).

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ /T-Zellen Spender B
6	22J, m	cALL-Rezidiv	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 34 ⁺	95,2%	0,005 / 0,118	84%

Tabelle 14: Charakteristik der Target- und Effektorzellen des Zytotoxizitätsassays

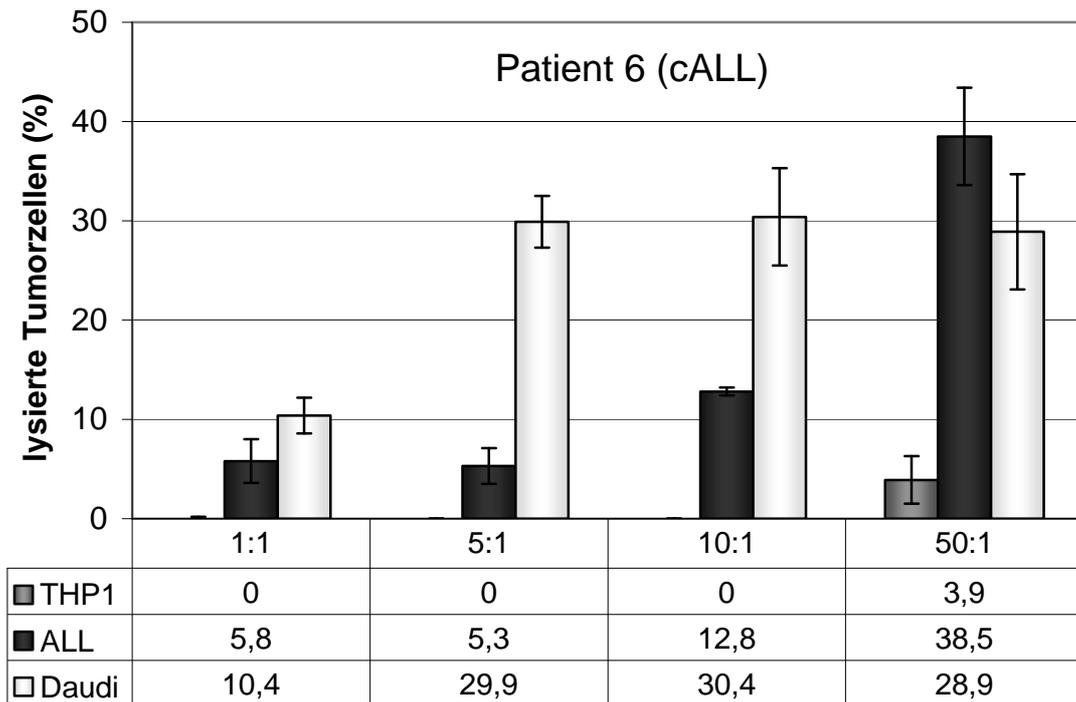


Abbildung 23: Die Zytotoxizität der mit BrHPP stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber der cALL (Pat. 6) bildete sich bereits bei einem Effektor : Target-Verhältnis : 1:1 aus und übertraf bei 50:1 sogar die Positivkontrolle mit Daudi.

Für die beiden nächsten Experimente wurde der Ansatz des Zytotoxizitätsassays wiederum um die nach der Zellseparation tumorzellarme Negativfraktion als Target erweitert. Für Patient 7 mit der Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie (Tab. 15) fand sich gegenüber den 96,1 % in der Positivfraktion lediglich ein Anteil von 2,3 % CD10⁺/19⁺ Zellen in der Negativfraktion.

Die maximale LDH-Freisetzung beider Targets und somit das LDH-Intervall waren relativ gering (0,006 – 0,048 für die tumorzellreiche Fraktion, 0,004 – 0,039 für die tumorzellarme Fraktion). Wie im Versuch mit Patient 4 beschrieben, hatte dies auch hier eine große Standardabweichung der berechneten Werte zur Folge. Die Mittelwerte zeigen eine vorliegende lytische Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen des Normalspenders A sowohl gegen die Positivfraktion als auch geringer ausgeprägt gegen die Negativfraktion (Abb. 24).

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ /T-Zellen Spender A
7	22J, m	Prae-B-ALL	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 34 ⁺	96,1%	0,006 / 0,048	89,8%

Tabelle 15: Die Targetzellen des Patienten 7 hatten im Vergleich zu den vorherigen Versuchen eine relativ geringe maximale LDH-Freisetzung.

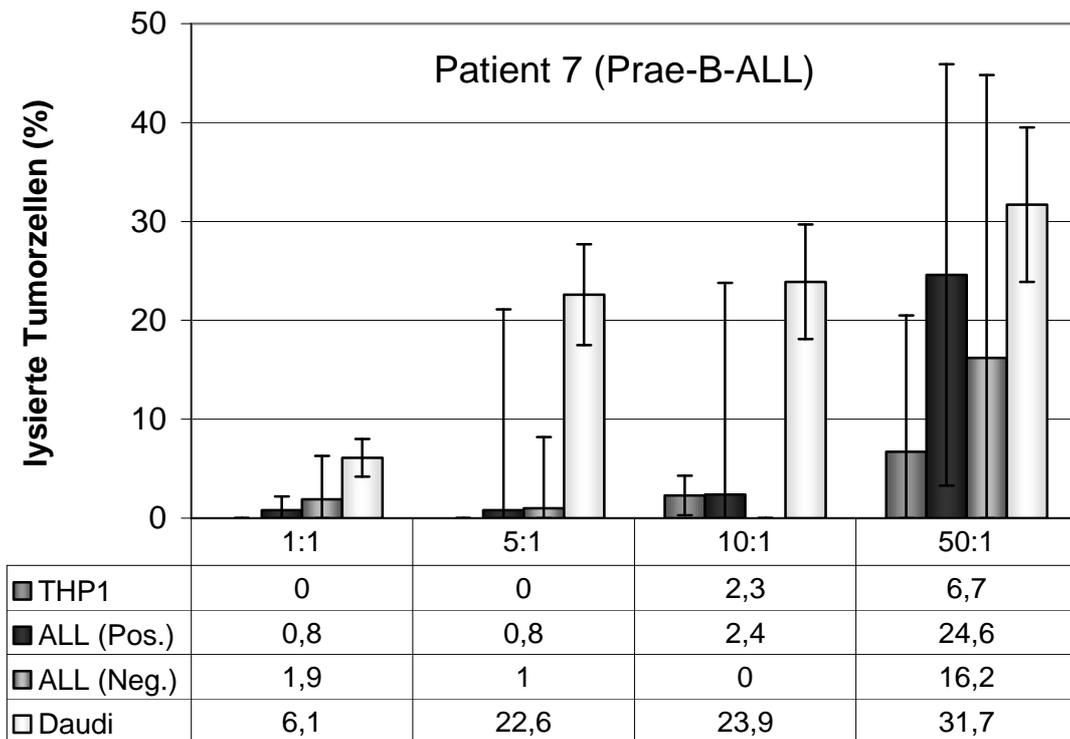


Abbildung 24: Neben dem eigentlichen Target (Prae-B-ALL) wurde zusätzlich die nach magnetischer Zellseparation gewonnene tumorzellarme Fraktion (Neg.) mitgeführt. Aufgrund der relativ niedrigen maximalen LDH-Freisetzung beider Targets kam es methodisch bedingt zu einer breiten Streuung der Werte.

Von Patient 8 (Tab. 16) wurden blastäre Zellen einer insgesamt dritten akuten lymphatischen Leukämie untersucht. Die analog zum vorherigen Versuch gewonnene Positivfraktion beinhaltete 86,3 % CD10⁺/19⁺ Blasten, die Negativfraktion hingegen nur 0,46 %. Die Effektorzellen des Spenders A mit 79,5 % $\gamma\delta^+$ T-Zellen lysierten einen deutlichen Anteil der Blasten. Bei maximaler Effektorzellzahl übertrafen die Werte sogar die Positivkontrolle mit Daudi. Dagegen lagen die Ergebnisse mit der nahezu tumorzellfreien Negativfraktion lediglich bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 5:1 im Bereich nachweisbarer Zytotoxizität (Abb. 25).

Trotz des kleinen LDH-Intervalls der tumorzellreichen Fraktion (0,008 – 0,048) und der tumorzellarmen Fraktion (0,023 – 0,121) konnten im Bezug auf die Standardabweichung relativ homogene Werte gemessen werden.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung Min. / max.	$\gamma\delta^+$ / T-Zellen Spender A
8	23J, m	cALL	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 20 ⁺ , 34 ⁺	86,3%	0,008 / 0,048	79,5%

Tabelle 16: Charakteristik der tumorzellreichen Fraktion und der Effektorzellen

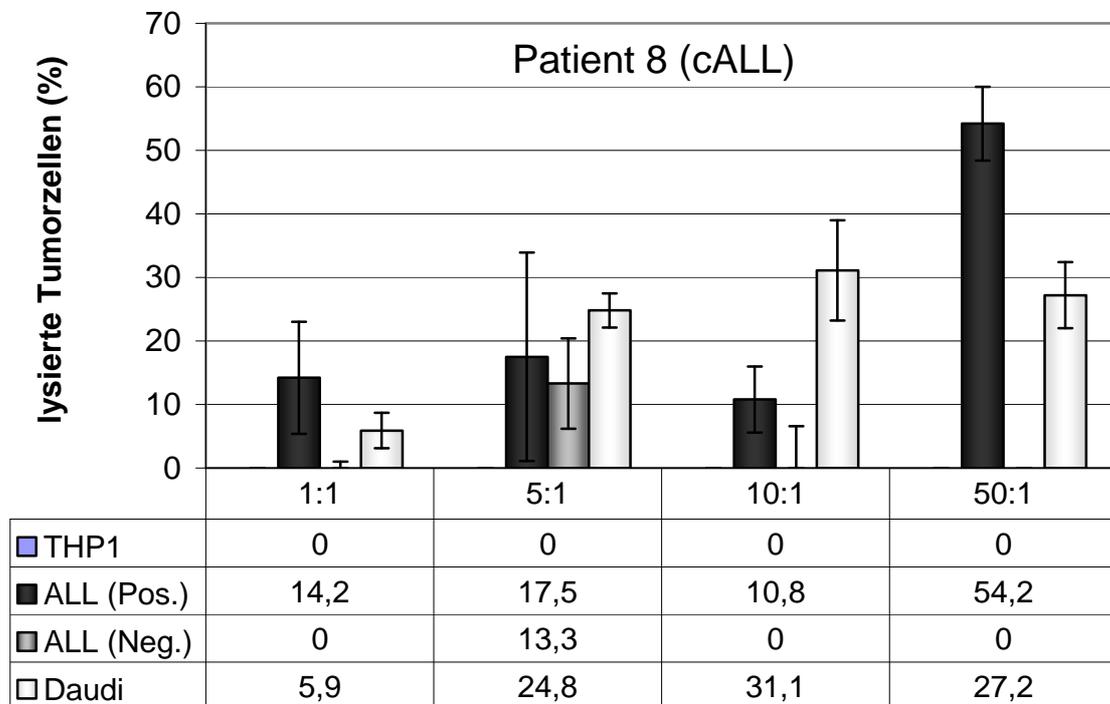


Abbildung 25: Während die Blastenzellen der cALL (Patient 8) deutlich durch die $\gamma\delta$ T-Zellen lysiert wurden, fand sich für die tumorzellarme Negativfraktion (Neg.) keine signifikante, titrierbare Zytotoxizität.

Ein Vergleich der drei untersuchten lymphatischen Leukämien (Patient 6 bis 8) verdeutlicht die schon bei niedriger Effektorzellzahl beginnende und zunehmende Lyse der Leukämiezellen durch die $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 26).

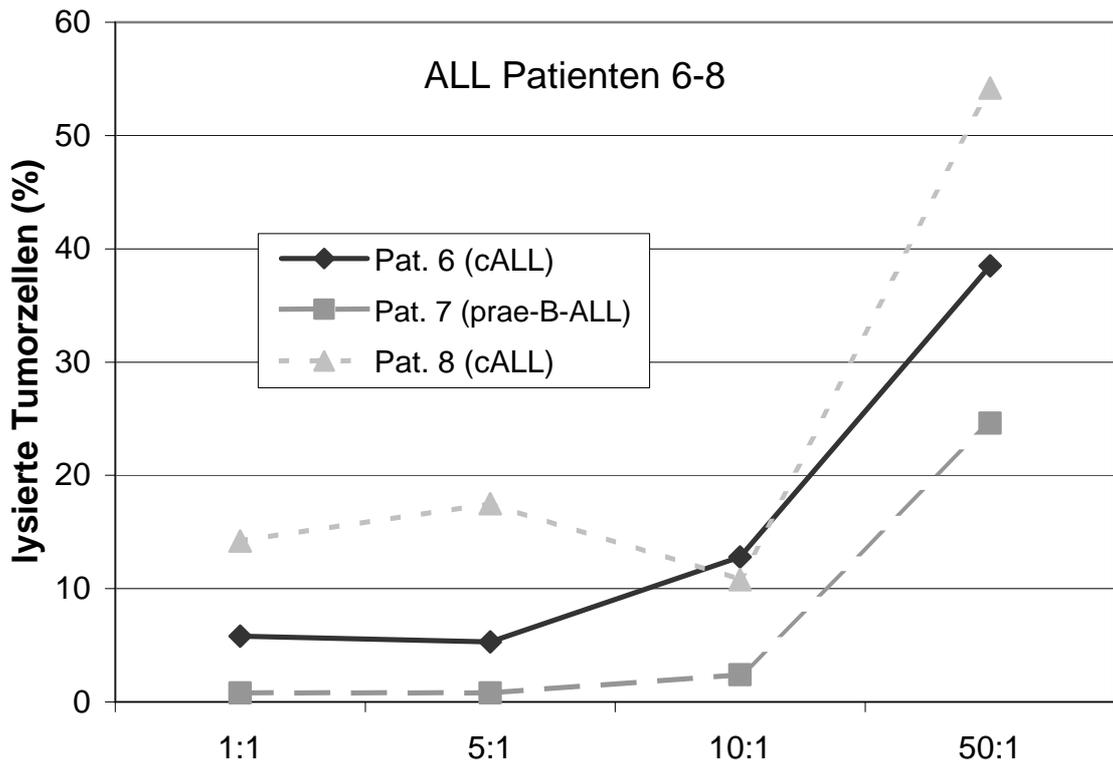


Abbildung 26: Vergleich der untersuchten Tumorzellen der Patienten 6, 7 und 8 mit der Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie. Die Werte sind ohne Standardabweichung aufgetragen.

Mit einem Anteil von 85,6 % Plasmazytomzellen wurden die Targetzellen des Patienten 9 (Tab. 17) gegenüber 81,6 % $\gamma\delta^+$ Effektorzellen exponiert. Messbare Zytotoxizität trat erst bei maximaler Effektorzellzahl auf (Abb. 27). Der Wert lag nur zweifach über der Negativkontrolle und zeigte eine Standardabweichung von fehlender Zytotoxizität bis über die Positivkontrolle hinaus.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ / T-Zellen Spender B
9	59J, m	Plasmazytom IgA κ , Stad. 3	CD38 ⁺ , 56 ⁺ , 138 ⁺	85,6%	0,027 / 0,136	81,6%

Tabelle 17: Targetzellen eines multiplen Myeloms (Plasmazytom). Stadieneinteilung nach Durie und Salomon

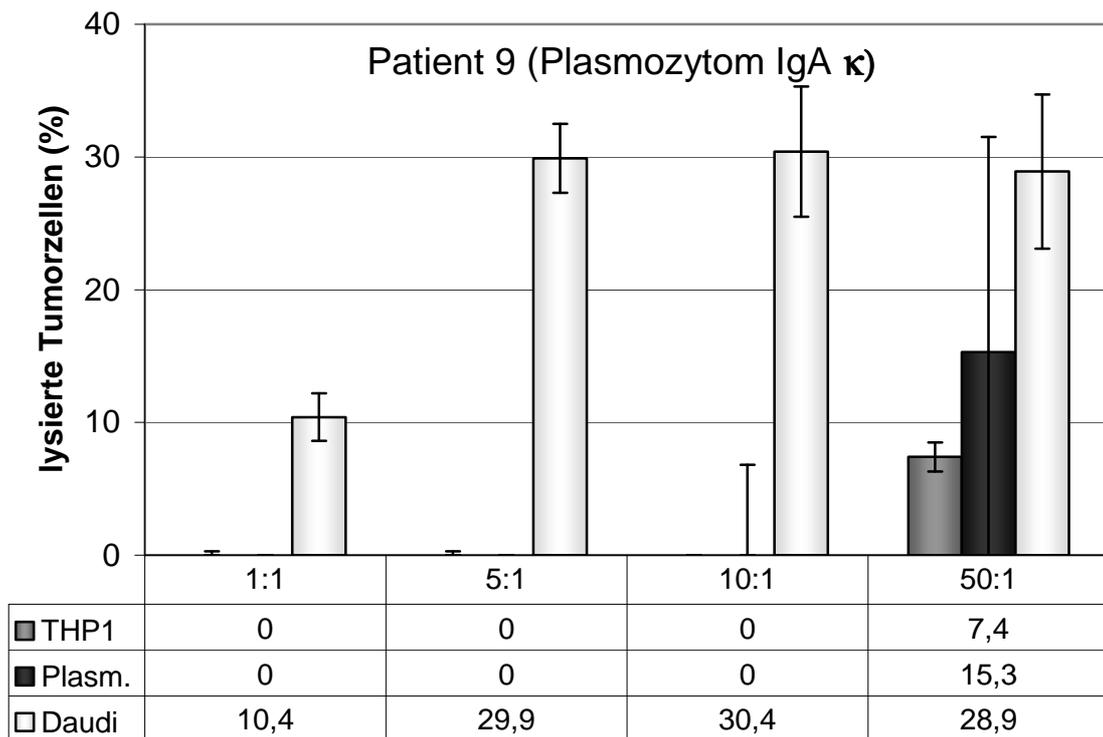


Abbildung 27: Messbare Zytotoxizität gegenüber den Plasmozytomzellen (Patient 9) fand sich erst bei maximaler Effektorzellzahl mit großer Standardabweichung.

4.4 Aktivierung und zytotoxisches Potential von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber mit Zoledronat vorbehandelter THP1 Zellen

Gewisse Targetzellen können durch Inkubation mit Bisphosphonaten in ihrem $\gamma\delta$ T-Zell aktivierenden Potential verändert werden. Die myelomonozytäre Zelllinie THP1 war in den vorherigen Experimenten nicht gegen die lytische Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen empfindlich und führte auch nicht – als Zeichen fehlender Aktivierung – zu einer CD69-Expression.

Für den folgenden Versuch wurden THP1 Zellen mit 100 μ M Zoledronat über 11 Stunden versetzt und anschließend dreimalig gewaschen. Entsprechend dem Ansatz in Kapitel 4.2 zur Messung der Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen wurden PBL des Normalspenders B mit den gewaschenen, ZOL-vorbehandelten THP1-Zellen (THP1 zol-ink.) untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 11 Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Messung für jedes PBL : THP1 zol-ink.

Verhältnis (von 1:1 bis 1:20) in Dreifachkontrollen. Aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten sich als Doppelfluoreszenz im rechten oberen Quadranten und sind in Abbildung 27 als Ergebnis mit einer 20-fachen Tumorzellzahl angegeben. Im Ansatz wurden unbehandelte THP1 (Negativkontrolle), ZOL-vorinkubierte THP1 und Daudi (Positivkontrolle) mitgeführt. Während es in Gegenwart von unbehandelten THP1 Zellen nur zu einer schwachen Aktivierung kam, stieg der Anteil an $CD69^+$ $\gamma\delta$ T-Lymphozyten durch die mit dem Bisphosphonat vorinkubierten THP1 Zellen auf 82,3 % an (Abb. 28).

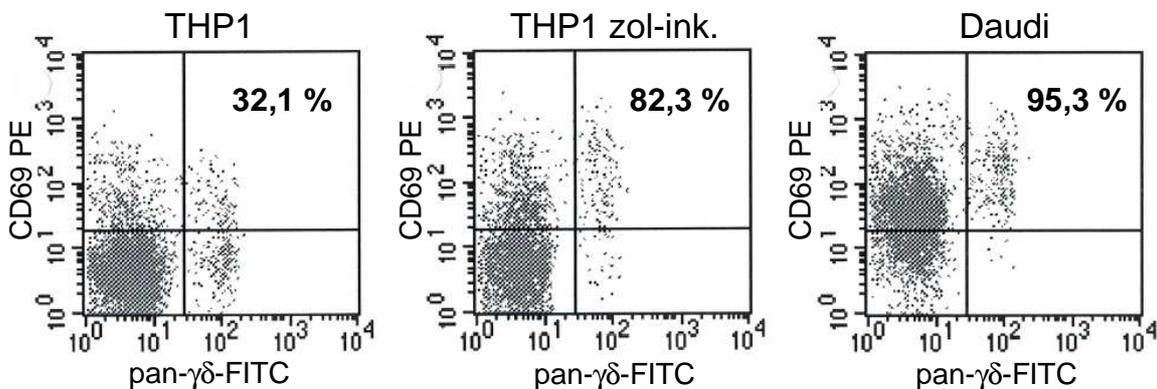


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Messung der $CD69^+$ $\gamma\delta$ T-Lymphozyten für ein PBL : Tumorzell-Verhältnis 1:20. Neben THP1 als Negativkontrolle (linke Abb.) und Daudi als Positivkontrolle (rechte Abb.) wurden THP1 Zellen mit ZOL vorinkubiert und nach dreimaligem Waschen für diesen Ansatz verwendet (mittlere Abb.).

Die Abbildung 29 gibt die Zunahme der Aktivierung mit steigender Targetzellzahl wieder. Entgegen der Negativkontrolle mit unbehandelten THP1 liegen die Werte mit den vorinkubierten THP1 in der Größenordnung der Positivkontrolle Daudi für alle Effektor : Target-Verhältnisse.

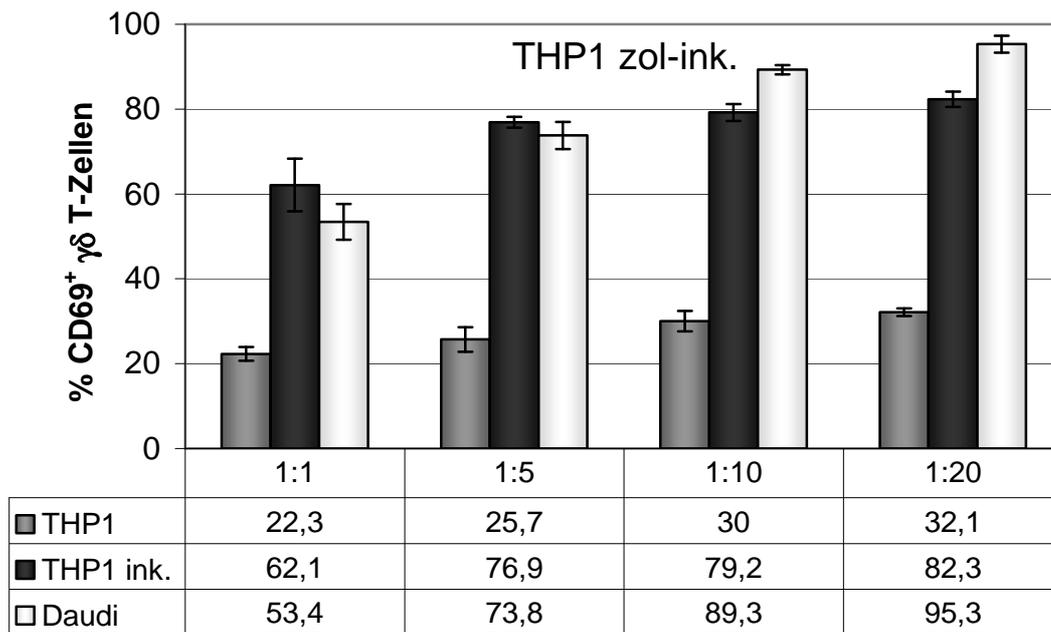


Abbildung 29: Nach vorheriger Inkubation mit 100 μ M ZOL erlangten die THP1 Zellen (THP1 zol-ink.) über alle Verhältnisse hinweg ein $\gamma\delta$ T-Zell aktivierendes Potential in Höhe der Positivkontrolle.

Mit der Frage, ob sich die Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen auch in lytische Aktivität gegenüber den ZOL-vorbehandelten THP1 Zellen auswirkt, wurde ein Zytotoxizitätsassay entsprechend den Versuchen in Kapitel 4.3. ausgeführt. Über 13 Tage auf 76,5 % $\gamma\delta$ T-Zellen angereicherte Effektorzellen des Normalspenders B wurden zusammen mit vorbehandelten THP1 Zellen als Target analysiert. Die spontane und die maximale LDH-Freisetzung (0,200 - 0,516) bildeten ein ausreichend großes Intervall.

Bereits bei einem Effektor : Target-Verhältnis von 1:1 fand sich ein deutlicher Anteil lysierter Targetzellen, der auf bis zu 33,2 % lysierte Targetzellen bei 50-facher Effektorzellzahl anstieg (Abb. 30). In diesem Experiment fiel die Positivkontrolle relativ niedrig aus. Auch im Vergleich mit der für den Spender B in einem anderen Experiment mit 37,3 % lysierter Daudi Zellen am höchsten gemessenen Positivkontrolle wurde die starke Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den mit ZOL vorbehandelten THP1 Zellen deutlich.

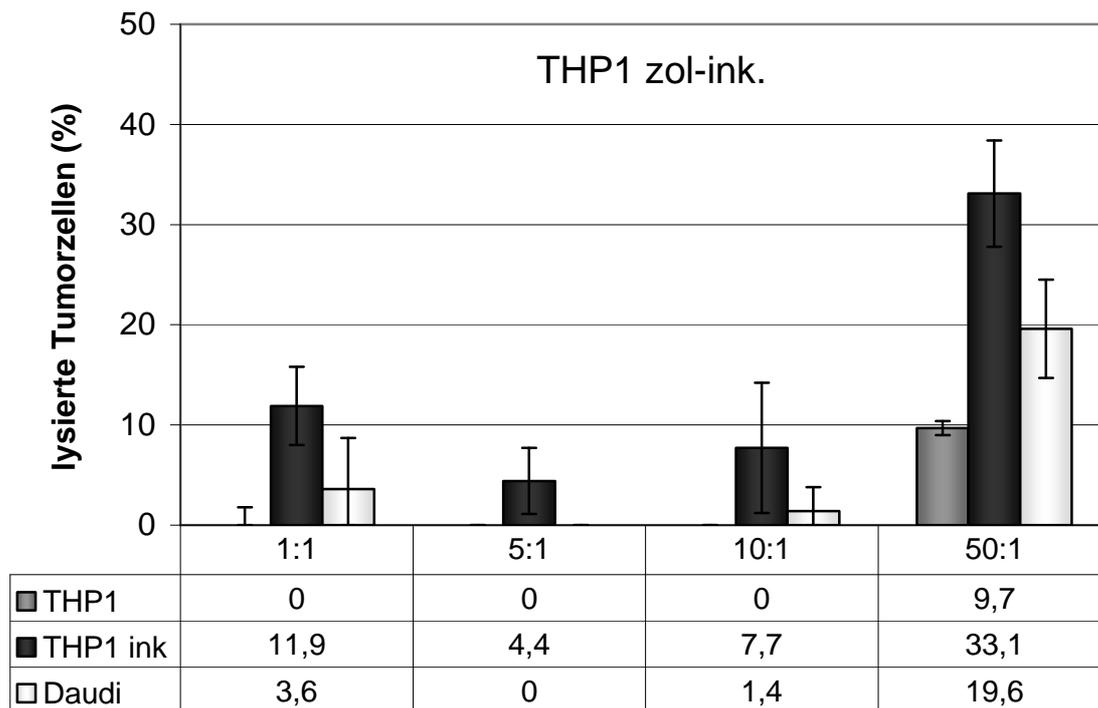


Abbildung 30: Durch vorherige Inkubation der THP1 Zellen mit 100 μ M ZOL (THP zol-ink.) konnten die $\gamma\delta$ T-Zellen diese lysieren.

Zusammenfassend wurde gezeigt, wie die myelomonozytäre Zelllinie THP1 im Gegensatz zu ihrer sonst vorliegenden Anergie nach Vorbehandlung mit einem Bisphosphonat (Zoledronat) zur Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen führte und gegenüber deren zytotoxischem Potential empfindlich wurde.

4.5 Aktivierung und zytotoxisches Potential von autologen $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Tumorzellen

Die bisherigen Experimente analysierten in einem heterologen System (Effektor- und Targetzellen von unterschiedlichen Personen) $\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Spender zusammen mit Tumorzellen von Patienten. In einem autologen System (Effektor- und Targetzellen von einem Patient) sollten die bisherigen Aspekte der Aktivierung und der Zytotoxizität der Effektorzellen, sowie der Einfluss einer ZOL-Inkubation auf die Targetzellen analysiert werden.

Die Diagnose des untersuchten Patienten war ein follikuläres B-Non-Hodgkin-Lymphom Grad 2-3 (WHO-Klassifikation), im Stadium IVA (Tab. 18). Nach Drittlinien-Chemotherapie, Antikörper- und Strahlentherapie kam es zu einer erneuten Lymphomprogredienz 7 Jahre nach Primärdiagnose. Ein klinisch progredienter occipitaler Lymphknoten von ca. 1cm x 1cm x 1cm wurde operativ entfernt und je zur Hälfte für die pathologisch-anatomische Untersuchung bzw. für die Experimente dieser Arbeit verwendet. Die Tumorzellen wurden nach unmittelbarer Aufbereitung teils direkt für Versuche verwendet, teils kryokonserviert. Zytologisch zeigten sich hier eindeutig monoklonale B-Zellen, die dem Lymphom zuzuordnen waren (übereinstimmend mit dem histologischen Befund einer Transformation in ein sekundär hochmalignes B-NHL, follikuläres Lymphom Grad III). Von den gewonnenen Targetzellen war der reine Anteil der Tumorzellen mit 63,8 % $CD10^+/19^+$ Zellen relativ hoch. Ebenso waren unter den aus dem Lymphknoten isolierten Zellen 6,3 % $\gamma\delta$ T-Lymphozyten nachzuweisen, die nahezu vollständig aktiviert zu 95,2 % CD69 exprimierten (Abb. 31). Eine Untersuchung der Subpopulationen der $\gamma\delta$ T-Zellen ergab ein Überwiegen der Zellen mit einer $V\delta 1$ -Kette gegenüber einer $V\delta 2$ -Kette in einem Verhältnis von 1,8 : 1.

Lymphknoten-Zellen follikuläres B-NHL

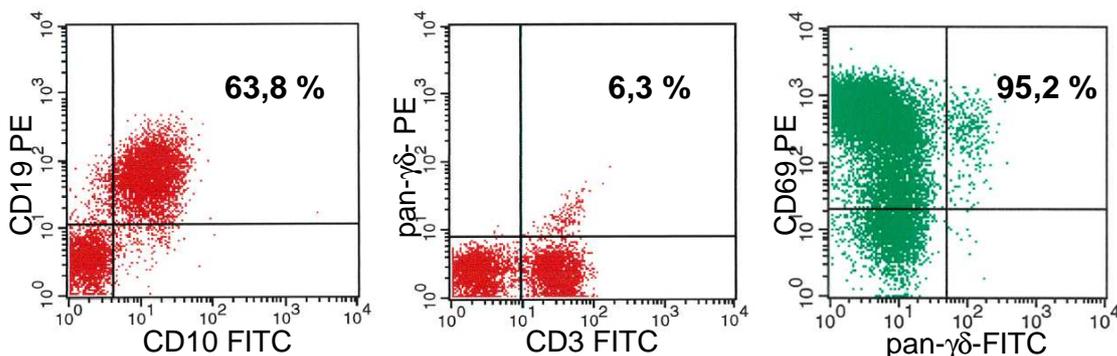


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Messung der aus einem Lymphknoten des Patienten 11 (follikuläres B-NHL, Grad II-III) aufbereiteten Zellen. Zu über 63 % lagen Lymphomzellen vor ($CD10^+/19^+$, linke Abb.), beinhaltet waren aber auch 6,3 % $\gamma\delta$ T-Lymphozyten (mittlere Abb.), die mit einem Anteil von 95,2 % nahezu vollständig stimuliert CD69 exprimierten (rechte Abb.).

Ein Vergleich der aus dem Lymphknoten gewonnenen $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 31) mit peripheren Lymphozyten des Patienten (Abb. 32 und 33 Tag 0) zeigt, dass in dem maligne entarteten Lymphknoten 6,3 % gegenüber 2,1 % der T-Zellen im venösen Blut $\gamma\delta$ TZR-positiv waren. Während sich im venösen Blut nur eine geringe Aktivierung fand, waren in dem Lymphknoten nahezu alle $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert (CD69⁺).

Mit der Frage, ob sich die peripheren Blutlymphozyten auch wie die eines gesunden Spenders aktivieren und expandieren lassen, wurden diese über 9 bis 13 Tage mit dem Bisphosphonat Zoledronat (3,65 μ M) inkubiert. Trotz des mit initial 2,1 % relativ niedrigen $\gamma\delta$ T-Zellanteils des Patienten kam es über 7,5 % am Tag 6 noch zu einer deutlichen Expansion bis auf 61,3 % aller T-Zellen am Tag 13 (Abb. 32). Auch die absolute Zellzahl der Patientenzellen stieg in diesem Zeitraum an und betrug am Tag 9 das 1,7-Fache des Ausgangswertes am Tag 0. Diese Effektorzellen waren mit einem Anteil von 39,9 % CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Lymphozyten am Tag 13 im Vergleich zu 5,8 % am Tag 0 auch deutlich aktiviert (Abb. 33).

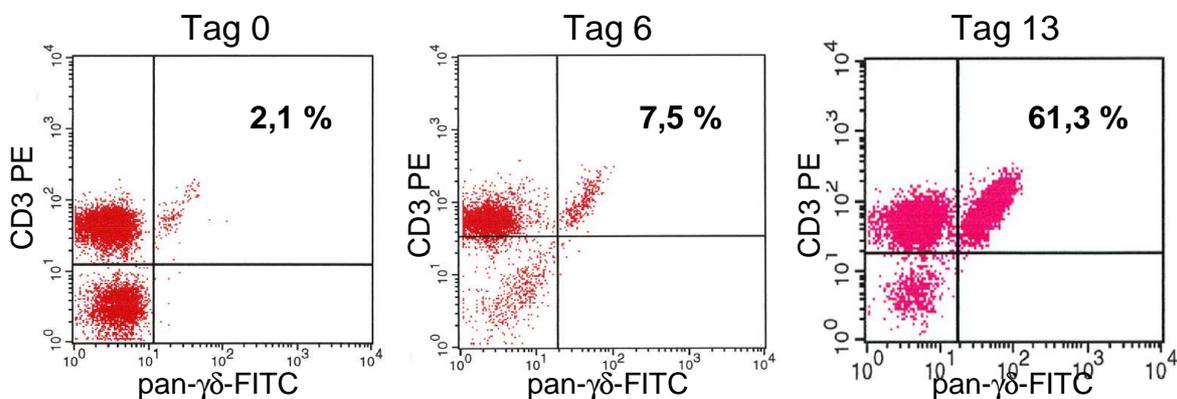


Abbildung 32: Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen des Patienten durch 3,65 μ M ZOL. Nach 13 Tagen waren 61,3 % der T-Zellen $\gamma\delta$ TZR positiv (rechter oberer Quadrant im Bezug auf rechten und linken oberen Quadranten).

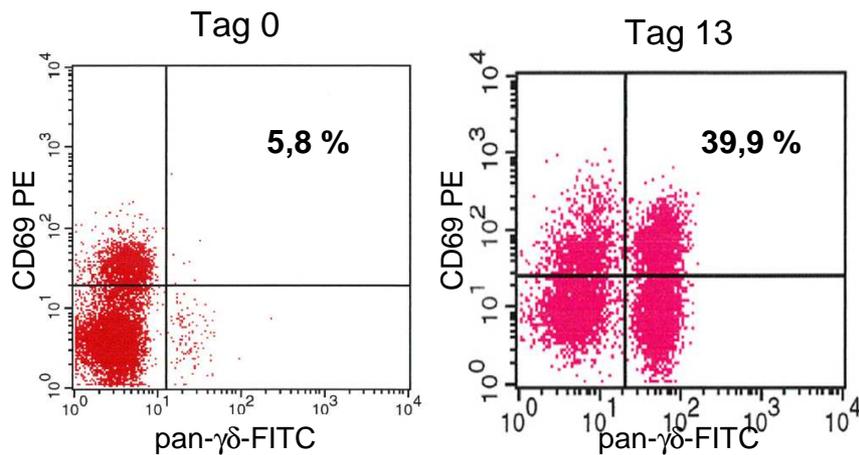


Abbildung 33: Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten des Patienten sichtbar als Doppelfluoreszenz im rechten oberen Quadranten im Bezug auf alle $\gamma\delta$ T-Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten. Die Messung erfolgte am Tag 0 und nach 13-tägiger ZOL-Inkubation.

In einem Parallelansatz mit PBL des Normalspenders A und ZOL waren ausgehend von 5,7 % am Tag 0, über 29,7 % am Tag 6, nach 13 Tagen 87,5 % der T-Zellen $\gamma\delta$ TZR positiv und davon 2,3 % am Tag 0 und 24,9 % am Tag 13 stimuliert. Hieraus wird ersichtlich, dass sich aus den PBL des Patienten die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten annähernd in die Größenordnung eines Normalspenders expandieren ließen. Die Grundstimulation, sowie die Stimulation nach 13 Tagen lagen über der eines gesunden Spenders.

Die im Vergleich zum Lymphknoten weniger stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen unter den peripheren Blutlymphozyten des Patienten sollten weiter untersucht werden. PBL des Patienten wurden mit dem Normalspender A bezüglich der CD69-Expression verglichen. Um bei der Durchflusszytometrie etwa die gleiche Absolutzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen zu messen, wurden im Experiment dreimal mehr PBL des Patienten als die des Spenders angesetzt. In Tabelle 18 ist die höhere Aktivierung der $\gamma\delta$ Zellen des Patienten bei alleiniger 12-stündiger Inkubation ersichtlich, die sich in Gegenwart von ZOL noch leicht steigern ließ. Im Vergleich hierzu fand sich bei dem Normalspender eine niedrigere Grundstimulation der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, während die Werte nach ZOL-Inkubation in derselben Größenordnung lagen.

	PBL (Pat.)	PBL (Nsp. A)	PBL-ZOL (Pat.)	PBL-ZOL (Nsp. A)
% CD 69 ⁺ / $\gamma\delta$ T-Zellen	19%	9,2%	24,1%	25,3%

Tabelle 18: Anteil der CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen in Bezug auf alle sich unter den peripheren Blutlymphozyten befindlichen $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Werte vergleichen eine 12-stündige Inkubation des Patienten mit der des Normalspenders A alleine und unter Zusatz von 10 $\mu\text{g/ml}$ (= 36,5 μM) ZOL.

Die Aktivierung der in den PBL befindlichen $\gamma\delta$ T-Zellen war noch steigerbar, wie in einem Versuch mit der Zelllinie Daudi gezeigt werden konnte. Nach 12-stündiger Inkubation stieg der Anteil der CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Lymphozyten des Patienten bei einem Verhältnis (PBL : Daudi) von 1:20 bis auf 67,1 % an (Abb. 34).

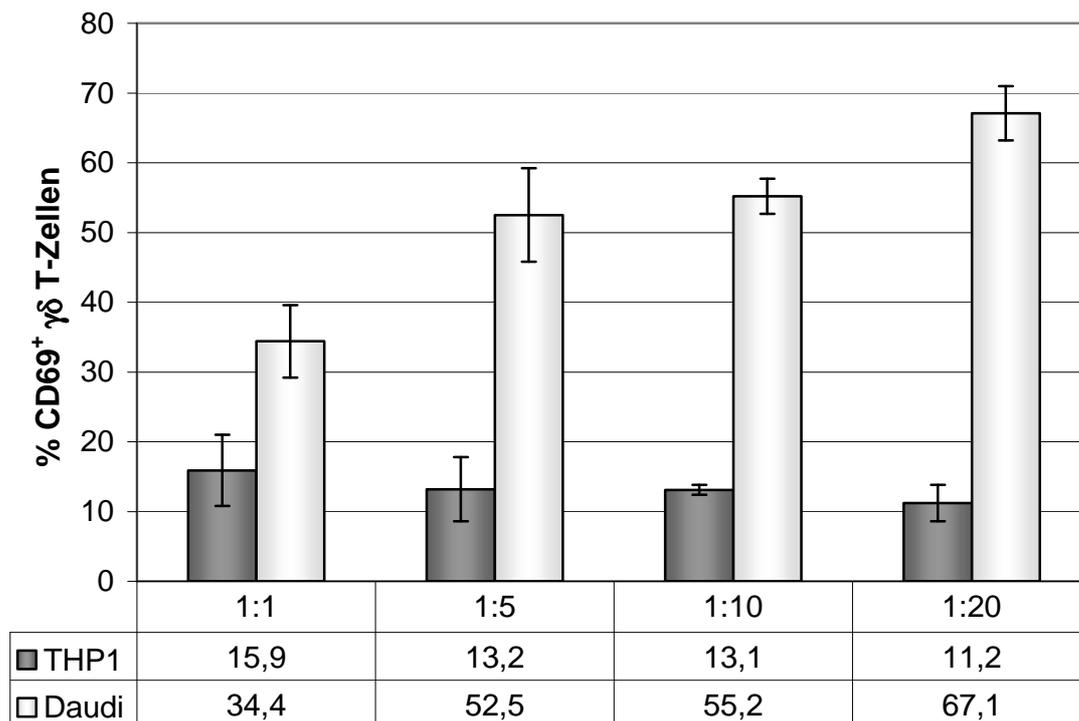


Abbildung 34: Der Anteil der CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen unter den PBL des Patienten 11 stieg nach einer Inkubation mit bis zu einer 20-fach höheren Konzentration von Daudi-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle mit THP1 deutlich an.

Die Untersuchung der $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation mit PBL des Patienten durch Inkubation mit seinen eigenen Tumorzellen konnte nicht nach dem

Standardansatz gemessen werden. Der hohe Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen in der aus dem Lymphknoten gewonnenen Zellfraktion und deren hohe CD69-Stimulation waren gegenüber dem Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen in den peripheren Blutlymphozyten für einen solchen Ansatz zu dominierend.

Nachdem die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten der beiden gesunden Spender in den bisherigen Versuchen Anti-Tumoraktivität bewiesen, erfolgte erstmals ein Experiment mit den ZOL-expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen des Patienten zusammen mit seinen eigenen Tumorzellen. Zur Untersuchung, ob eine ZOL-Vorbehandlung der Tumorzellen mehr Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren kann, wurden die aus dem Lymphknoten gewonnenen Zellen als zusätzliches Target mit 100 μ M ZOL über 7 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit waren bereits 20 - 30 % sowohl der ZOL-inkubierten als auch der nicht inkubierten Zellen lysiert. Nach dreimaligem Waschen und Abtrennung des toten Zellanteils wurde ein Zytotoxizitätsassay gemäß des Standardansatzes mit einer bis zu 50-fach höheren Effektorzellzahl durchgeführt.

Für die expandierten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten des Patienten konnte dabei eine lytische Aktivität gegenüber seinen eigenen Tumorzellen nachgewiesen werden. Mit steigender Effektorzellzahl nahm auch deren zytotoxisches Potential zu und führte zu einer Lyse von bis zu 29,5 % der Tumorzellen (Abb. 35).

Im selben Ansatz wurden die ZOL-vorbehandelten Tumorzellen als zusätzliches Target mitgeführt. Die Abbildung 35 veranschaulicht die bis hin zu einem maximalen Effektor : Target-Verhältnis von 50:1 ansteigende Zytotoxizität gegenüber diesen vorbehandelten Lymphomzellen. Dabei wurde das zytotoxische Potential der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gegenüber den Tumorzellen durch die ZOL-Vorbehandlung sogar noch verstärkt. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Experimenten. Die große Standardabweichung ist vor allem durch die relativ geringe LDH-Freisetzung der Tumorzellen bedingt (LDH min./max.: 0,027 – 0,100 für die unbehandelten Lymphomzellen und 0,024 – 0,089 für die vorinkubierten Lymphomzellen).

Dadurch haben kleine Unterschiede in der gemessenen LDH-Enzymaktivität einen relativ großen Einfluss auf die berechnete Zytotoxizität.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Tumor- zellen	LDH-Freisetzung min. / max.	$\gamma\delta^+$ /T-Zellen Patient
11	59J, m	Follik. B-NHL Grad II-III	CD5 ⁻ , 10 ⁺ , 19 ⁺ , κ^+	63,8%	0,027 / 0,100	61,3%

Table 19: Die Lymphomzellen des Patient 11 als Targetzellen wurden in diesem Ansatz nicht mittels magnetischer Zellseparation angereichert. Die spontane, minimale LDH-Freisetzung ist im Vergleich zu anderen Versuchen relativ hoch, bzw. das LDH-Intervall relativ niedrig..

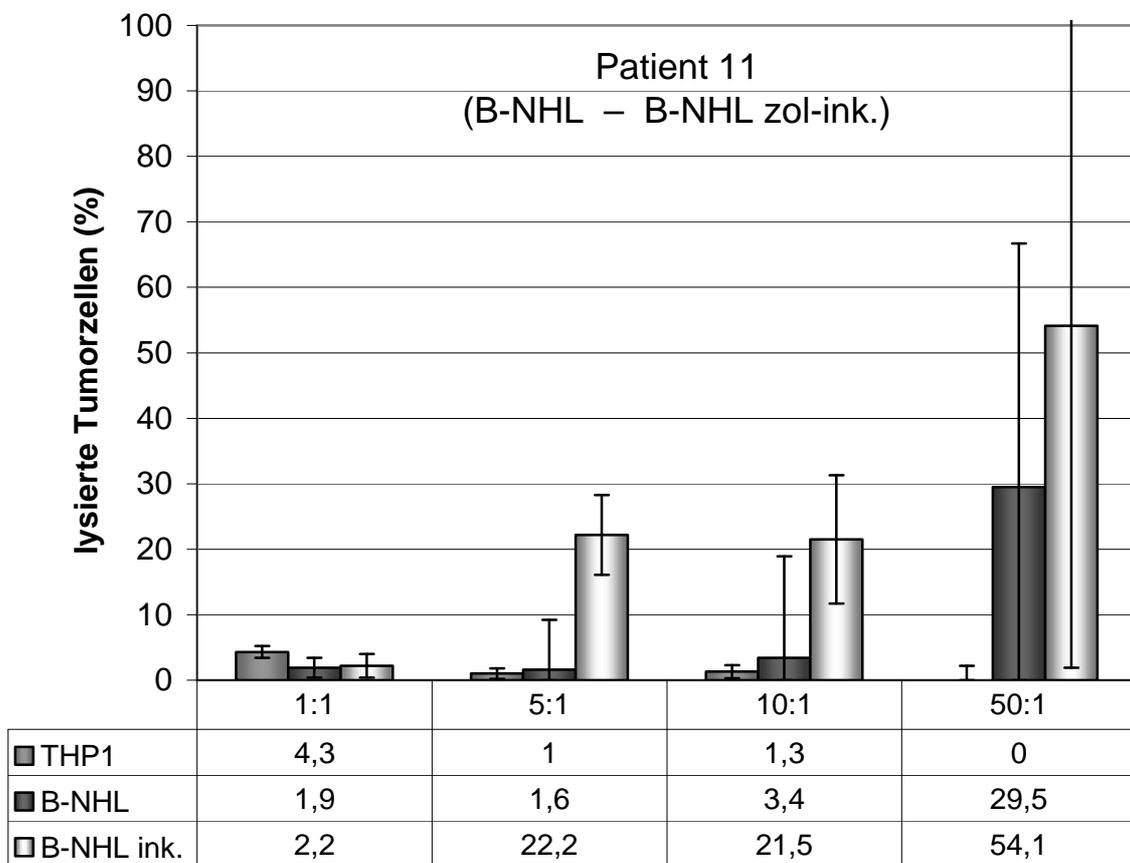


Abbildung 35: Die $\gamma\delta$ T-Zellen des Patienten 11 lysierten bis zu 29,5 % der patienteneigenen Tumorzellen und nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit 100 μ M ZOL (B-NHL zol-ink.) wurden sogar 54,1 % der Tumorzellen lysiert. Die gemessenen Werte hatten eine große Standardabweichung.

4.6 Gegenüberstellung von Aktivierung und Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen aus den durchgeführten Experimenten

Zum Vergleich der Aktivierung (Kap. 4.2) von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit deren lytischer Aktivität (Kap. 4.3) wurden alle bisherigen Ergebnisse der Patienten 1 bis 11 in der Tabelle 20 gegenübergestellt.

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnose	Immunphänotyp	Aktivierung von nativen $\gamma\delta$ T-Zellen	Lyse durch aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen
1	61J, w	Sek. AML M4 nach MDS	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁻ , HLA-Kl. I ⁺	+++	+++
2	52J, m	AML M2	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	-	+++
3	49J, m	AML M4	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	-	+++
4	68J, w	AML M4/M5	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁻ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	- / +	(+)
5	68J, m	Sek. AML M2 nach MDS	CD13 ⁺ , 33 ⁺ , 34 ⁺ , c-kit ⁺ , HLA-Kl. I ⁺	n.e.	(++)
6	22J, m	CALL	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 34 ⁺	n.e.	+++
7	22J, m	Prae-B-ALL	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 34 ⁺	-	(+++)
8	23J, m	CALL	CD10 ⁺ , 19 ⁺ , 20 ⁺ , 34 ⁻	n.e.	+++
9	59J, m	Plasmozytom IgA κ , Stad. 3	CD38 ⁺ , 56 ⁺ , 138 ⁺	n.e.	(+)
10	78J, w	B-CLL	CD5 ⁺ , 10 ⁻ , 19 ⁺ , 23 ⁻	+	n.d.
11	59J, m	Follik. B-NHL Grad II-III	CD5 ⁻ , 10 ⁺ , 19 ⁺ , κ ⁺	n.e.	(+++)

Tabelle 20: Die Ergebnisse der nach dem Standardansatz untersuchten Tumorzellen der Patienten 1 bis 11 wurden bzgl. deren Aktivierung von nativen $\gamma\delta$ T-Zellen (CD69-Expression) und bzgl. deren Empfindlichkeit für das zytotoxische Potential aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen gegenübergestellt

Skalierung für das Aktivierungspotential: +++ = Aktivierung über das 3-Fache der Negativkontrolle mit THP1, ++ = das 2 – 3-Fache von THP1, + = 1,5 – 2-Fache, - = weniger als das 1,5-Fache von THP1

Skalierung für die Lyse der Tumorzellen: +++ = lysierte Tumorzellen betragen >75% der Positivkontrolle mit Daudi, ++ = 50 – 75%, + = 25 – 50% im Vergleich zu Daudi.

+Zeichen in Klammer () zeigen eine in den Bereich der Negativkontrolle reichende Standardabweichung an

n.e. = Untersuchung nicht erfolgt, bzw. n.d. = nicht durchführbar

Das Potential der Tumorzellen native $\gamma\delta$ T-Zellen zu aktivieren konnte für 4 Patienten mit einer AML und für einen Patienten mit einer ALL der Zytotoxizität aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen direkt gegenübergestellt werden. Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wiesen dabei von einer maximalen bis hin zur fehlenden Aktivierung sehr unterschiedliche Werte auf.

Mit den Tumorzellen der 11 Patienten konnten 5 Fälle mit einer akuten myeloischen Leukämie, 3 Fälle mit einer akuten lymphatischen Leukämie, eine chronisch lymphatische Leukämie, ein aggressives B-Non-Hodgkin-Lymphom und ein Plasmozytom untersucht werden. Mit Ausnahme von Patient 10 – dessen Auswertung war wegen einer zu niedrigen LDH-Freisetzung nicht möglich – waren alle Tumorzellen gegenüber der Anti-Tumoraktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen empfindlich. Allerdings zeigten die Messungen teils eine große – bis in den Bereich der Negativkontrolle reichende – Standardabweichung (durch Klammer () in der Tabelle 20 gekennzeichnet).

Die zytotoxische Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen kann durch die Expression von HLA-Klasse I Molekülen an der Oberfläche von Tumorzellen beeinflusst werden. Die HLA-Klasse I Merkmale der Tumorzellen (Zelllinien und Patienten 1 bis 5) wurden in der Tabelle 21 ihrer Lyse und ihrem aktivierenden Potential gegenübergestellt. Für die Patienten 6 bis 11 lagen keine Informationen über die HLA-Klasse I Expression vor.

Eine Abhängigkeit der Aktivierung nativer $\gamma\delta$ T-Zellen oder des zytotoxischen Potentials aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen von der HLA-Klasse I der Tumorzellen konnte nicht beobachtet werden. Sowohl HLA-Klasse I⁻ Daudi Zellen, als auch HLA-Klasse I⁺ U-226 Zellen konnten lysiert werden, während sich die HLA-Klasse I⁺ Zelllinie THP1 anerg verhielt. Die Tumorzellen der Patienten 1 bis 5 exprimierten alle HLA-Klasse I und waren gegenüber der Lyse der $\gamma\delta$ T-Zellen empfindlich.

Ebenso konnten die HLA-Klasse I⁺ Tumorzellen zu einer fehlenden bis hin zu einer maximalen Aktivierung führen und ließen damit auch keine HLA-Klasse I Abhängigkeit erkennen (Tab. 21).

Zelllinie/ Patient	Abstammung/ Diagnose	HLA-Klasse I der Tumorzellen	Aktivierung von nativen $\gamma\delta$ T-Zellen	Lyse durch aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen
Daudi	Burkitt Lymphom	HLA-Kl. I ⁻	+++	+++
THP1	AML	HLA-Kl. I ⁺	-	-
U-226	Multiples Myelom	HLA-Kl. I ⁺	n.e	+++
1	Sek. AML M4 nach MDS	HLA-Kl. I ⁺	+++	+++
2	AML M2	HLA-Kl. I ⁺	-	+++
3	AML M4	HLA-Kl. I ⁺	-	+++
4	AML M4/M5	HLA-Kl. I ⁺	- / +	(+)
5	Sek. AML M2 nach MDS	HLA-Kl. I ⁺	n.e.	(++)

Tabelle 21: Vergleich der HLA-Klasse I Merkmale der Tumorzellen mit der Aktivierung und dem zytotoxischen Potential der $\gamma\delta$ T-Zellen für die untersuchten Tumorzelllinien und für die Patienten 1 bis 5. Für die Patienten 6 bis 11 lagen keine Informationen über die HLA-Klasse I Expression vor.

Skalierung für das Aktivierungspotential: +++ = Aktivierung über das 3-Fache der Negativkontrolle mit THP1, ++ = das 2 – 3-Fache von THP1, + = 1,5 – 2-Fache, - = weniger als das 1,5-Fache von THP1

Skalierung für die Lyse der Tumorzellen: +++ = lysierte Tumorzellen betragen >75% der Positivkontrolle mit Daudi, ++ = 50 – 75%, + = 25 – 50% im Vergleich zu Daudi.

+ - Zeichen in Klammer () zeigen eine in den Bereich der Negativkontrolle reichende Standardabweichung an

n.e. = Untersuchung nicht erfolgt

5. Diskussion

Humane $V\gamma 9V\delta 2$ T-Lymphozyten sind an der Immunabwehr infizierter oder maligner transformierter Zellen maßgeblich beteiligt und besitzen zytotoxische Aktivität. Die beiden wesentlichen Strategien zur Nutzung dieses Potentials für Immuntherapien maligner Erkrankungen beruhen zum einen auf der in vitro Expansion von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit anschließendem adoptiven Zelltransfer auf den Patienten und zum anderen auf einer direkten in vivo Stimulation der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten.

Voraussetzung für die klinische Anwendung eines adoptiven Zelltransfers sind potente Antigene zur Stimulation und Proliferation einer ausreichenden Menge an $\gamma\delta$ T-Zellen. Hochaffine Liganden durch Gewinnung aus natürlichen Ressourcen wie Mikroorganismen in größerer Menge zu gewinnen, ist nur schwer möglich. Durch chemische Modifikation eines natürlichen Liganden konnte das stabile, hoch potente und leicht in großen Mengen zu synthetisierende, phosphorylierte Bromohydrin (BrHPP) abgeleitet werden.¹² In vitro führt BrHPP zusammen mit IL-2 zu einer selektiven Expansion von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Lymphozyten, ohne signifikante Zunahme anderer Zellpopulationen wie Monozyten, B-Zellen, NK-Zellen oder $\alpha\beta$ T-Zellen. Hierbei kommt es ebenfalls zur Freisetzung von IFN- γ und TNF- α , was auch auf die durch BrHPP erfolgte Aktivierung der Effektorfunktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen hinweist.¹²

In der vorliegenden Arbeit wurden periphere Blutlymphozyten zweier gesunder Spender über 12 bis 16 Tage mit BrHPP und niedrig dosiertem IL-2 expandiert. Dabei verdoppelte bis vervierfachte sich die Gesamtzahl der ursprünglich kultivierten PBL in diesem Zeitraum, wobei der Anteil der $\gamma\delta^+$ T-Zellen in den Experimenten von initial 4 % bis 6 % auf 75 % bis 92 % aller T-Zellen anstieg (Kap. 4.1). Zu jedem im Kapitel 4.3 aufgeführten Zytotoxizitätsassay erfolgte eine solche Anreicherung, wodurch dieses Verfahren zahlreich angewandt wurde.

In einer Studie einer anderen Arbeitsgruppe wurden PBL von 7 gesunden Spendern ebenfalls über 2 Wochen mit BrHPP und IL-2 expandiert.⁴³ Der Ansatz erfolgte dabei in 24-Well-Platten mit 3 μ M BrHPP und einer Zelldichte

von 2×10^6 PBL/ml im Gegensatz zum Ansatz dieser Arbeit mit 96-Well-Platten, $1 \mu\text{M}$ BrHPP und einer Zelldichte von 1×10^6 PBL/ml. Auch wurde für das Proliferationsassay der erwähnten Studie alle drei Tage BrHPP hinzugefügt, während in der vorliegenden Arbeit nur initial die Zugabe von BrHPP erfolgte. Ähnlich zu unseren Ergebnissen wurde eine selektive Expansion auf 80 bis 96,4 % $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erzielt. Die Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zellzahl wurde in dieser Studie auf das 141- bis 1236-Fache angegeben, was unsere Werte – eine Zunahme bis auf das 90-Fache der initialen $\gamma\delta$ -Zellzahl – übertreffen würde. In unseren Vorversuchen zeigte sich für 3×10^6 PBL/ml in 24-Well-Platten bei BrHPP und bei ZOL ein deutlich schlechteres Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen als in 96-Well-Platten (Ergebnisse wurden in dieser Arbeit nicht aufgeführt). Möglicherweise führte in der erwähnten Studie die alle 3 Tage wiederholte Zugabe von BrHPP zu dieser noch stärkeren Expansion der $\gamma\delta$ T-Zellen. Ein direkter Vergleich zwischen nur initialer und intermittierender Zugabe von BrHPP wäre im Hinblick auf Proliferation und Aktivierungsmarker für weitere Untersuchungen interessant.

Für die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen ist ebenfalls das Zytokin IL-2 als Wachstumsfaktor ein essentieller Bestandteil. Während die CD69-Expression als Zeichen der Aktivierung auch durch ein Phosphoantigen (BrHPP oder ABP) allein erfolgt, ist für das Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen zusätzlich niedrig dosiertes IL-2 notwendig.¹³ Für andere Phosphoantigene, wie IPP, wurde ebenso die Anwesenheit von IL-2 als Voraussetzung für eine $\gamma\delta$ -Expansion beschrieben.⁶³

In Kapitel 4.1 wird zusammenfassend eine Methode gezeigt, mit der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in großer Anzahl für in vitro Untersuchungen oder auch für einen potentiellen adoptiven Zelltransfer gewonnen werden können.

Bisphosphonate zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu den Phosphoantigenen, und Aminobisphosphonate – wie Pamidronat, Alendronat oder Ibandronat – können selektiv in vitro $V\gamma 9V\delta 2$ T-Lymphozyten expandieren.¹³ Zoledronat, ein Bisphosphonat der dritten Generation, gilt als potentestes Mittel. Diese Potenz spiegelt sich auch in der Fähigkeit wieder $\gamma\delta$ T-Zellen zu expandieren. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deckten sich mit Untersuchungen anderer

Arbeitsgruppen, die mit ZOL eine höhere Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen fanden als beispielsweise mit Ibandronat, einem anderen Bisphosphonat der dritten Generation.⁶⁴ Im Kapitel 4.5 des Ergebnisteils wurde beispielhaft eine selektive Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten eines gesunden Spenders von initial 5,7 % auf 87,5 % aller T-Zellen nach 13 Tagen durch ZOL dargestellt. Dabei kam es auch zu einer Zunahme der absoluten Zellzahl auf knapp das 3-Fache. Insgesamt aber hatten in 2 Voruntersuchungen zu dieser Arbeit die $\gamma\delta$ T-Zellen unter 3,65 μ M ZOL eine etwas niedrigere Expansionsrate (0,7-fach) als unter 1 μ M BrHPP (Ergebnisse wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt).

Die *in vitro* Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen ist für eine Reihe von Tumoren hämatologischen Ursprungs beschrieben. Neben Lymphom- und Plasmazytom-Zelllinien wurden auch autologe Leukämie-Blasten als $\gamma\delta$ T-Zell-empfindliche Targets identifiziert.^{13;18;19;29;55} Im autologen Tumormodell wurde in mit Pamidronat inkubierten Knochenmarkskulturen von Plasmazytom-Patienten eine mit der Aktivierung der V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten einhergehende Abnahme der malignen Plasmazellen beschrieben.¹³

Die Experimente dieser Arbeit untersuchten die Tumorzellen von insgesamt 11 Patienten mit hämatologischen Neoplasien. Durch die Expansion mit BrHPP standen $\gamma\delta$ T-Zellen gesunder Normalspender in ausreichender Anzahl zur Verfügung, um sie dann in bis zu 50-fach höherer Zellzahl als die Tumorzellen anzusetzen. Durch die auf der Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität basierenden Zytotoxizitätstests konnte für alle $\gamma\delta$ T-Zellen – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß – Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen nachgewiesen werden. Insbesondere für die 3 Patienten mit einer ALL konnte mit bis zu über 50 % ein hoher Anteil lysierter Tumorzellen gezeigt werden (Abb. 23 bis 26). Die Tumorzellen von 5 Patienten mit der Diagnose einer AML waren mit bis zu 23,6 % lysierter Tumorzellen ebenfalls ein empfindliches Target (Abb. 17 bis 22). Die $\gamma\delta$ T-Zellen entwickelten gegen die Plasmazytomzellen eines Patienten eine im Vergleich geringere Zytotoxizität (Abb 27). In allen Experimenten fand sich mit einem ansteigenden Effektor : Target-Verhältnis auch eine Zunahme der lytischen Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen.

Insbesondere gegenüber den Blasten-Zellen von insgesamt 8 Patienten mit einer AML oder ALL konnte das zytotoxische Potential der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in vitro deutlich nachgewiesen werden.

Der Zytotoxizitätsnachweis erfolgte über die Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität, einem Enzym das in allen Zellen des Körpers vorkommt und beim Tod der Zelle oder bei einer Plasmamembranschädigung freigesetzt wird.

Der Chromium-Release-Assay (^{51}Cr release assay) ist wegen seiner guten Reproduzierbarkeit noch immer die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität. Jedoch hat dieses Assay gewisse Nachteile, wie eine lange Inkubationszeit, sowie Kosten-, Entsorgungs- und Sicherheitsprobleme durch die Verwendung von radioaktiven Isotopen. Die ^{51}Cr -Aufnahme ist von der Proliferationsrate der Tumorzellen abhängig, was bei schlecht in vitro wachsenden Tumorzellen nur zu mäßig reproduzierbaren Ergebnissen führt. Für AML-Blasten von Patienten wurde sogar in Gegenwart von Wachstumsfaktoren – besonders vor dem Hintergrund einer hohen spontanen ^{51}Cr -Freisetzung – nur eine ungenügende ^{51}Cr -Aufnahme beschrieben.⁶⁵ Ein Zytotoxizitätsassay mit Messung der LDH-Freisetzung bietet eine sensitive, reproduzierbare und relativ günstige nicht-radioaktive Alternative, besonders für langsam proliferierende Tumorzellen.^{65;66}

Maligne Tumoren besitzen allerdings eine individuell unterschiedliche LDH-Enzymaktivität, was somit einen diese Testmethode beeinflussenden Faktor darstellt. Ein ausreichend großes Intervall zwischen maximaler und spontaner LDH-Freisetzung war eine Voraussetzung für die Bestimmung der Zytotoxizität. Von den untersuchten 11 Patienten war bei einem Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie die Bestimmung der Zytotoxizität wegen einer zu niedrigen LDH-Freisetzung nicht möglich. Generell konnte auch beobachtet werden, dass es mit kleiner werdendem LDH-Intervall zu einer zunehmenden Standardabweichung kam. Bei 5 Patienten war dies mit einer bis in den Bereich der Negativkontrolle hineinreichenden Standardabweichung der Fall. Hingegen stellte der LDH-Release-Assay für die untersuchten Tumorzelllinien und für die Tumorzellen mit deutlichem LDH-Intervall ein gutes Testverfahren dar.

Zunehmend werden auch Zytotoxizitätsnachweise basierend auf der Durchflusszytometrie evaluiert und deren Einsatz immer öfter beschrieben.

Nach Aktivierung von Zellen ändert sich die Expression der Oberflächenproteine und CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker auf T-Zellen. Mit monoklonalen anti-CD69 Antikörpern konnte die zytolytische Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Mastozytomzellen induziert werden und CD69 Moleküle scheinen die Initiierung einer zytotoxischen Aktivität mitzubewirken.⁶⁷ In den Proliferationsassays dieser Arbeit mit BrHPP oder ZOL war nach 14 Tagen ein deutlicher Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen in einem Bereich von 25 bis 50 % aktiviert. In einer eigenen Reihe an Untersuchungen (Kap. 4.2) wurde die Aktivierung von sich unter den PBL befindlichen nativen $\gamma\delta$ T-Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Tumorzellen analysiert. Unter den 5 verschiedenen Patienten mit einer Leukämie fand sich lediglich für einen Patienten mit einer AML eine deutliche Stimulation (Abb. 6 und 7). Die übrigen Leukämiezellen bewirkten nur eine fehlende bis schwache CD69-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 8 bis 13). Interessanterweise aber waren die Tumorzellen dieser 5 Leukämie-Patienten gegenüber dem lytischen Potential mit BrHPP expandierter und aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen empfindlich. Somit konnte eine CD69 Aktivierung von nativen $\gamma\delta$ T-Zellen durch Tumorzellen nicht mit dem zytotoxischen Potential dieser mit BrHPP aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen korreliert werden (Tab. 20). Zu beachten bei diesem Vergleich ist neben dem sehr kleinen Patientenkollektiv auch der völlig verschiedene Grundzustand der $\gamma\delta$ T-Zellen. In dem Aktivierungsassay erfolgte die Inkubation von nativen, sich unter den PBL befindlichen $\gamma\delta$ T-Zellen mit Tumorzellen. Für das Zytotoxizitätsassay wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen zuvor mit BrHPP und IL-2 über 12 bis 16 Tage expandiert und befanden sich in einem deutlich aktivierten Zustand. Die fehlende Korrelation zwischen CD69-Expression und Zytotoxizität könnte allerdings auch auf den verschiedenen Mechanismen der Zytotoxizität beruhen. Zum einen konnten TZR-abhängige Mechanismen durch Gentransferexperimente mit Übertragung des V γ 9V δ 2-TZR oder durch gegen den TZR gerichtete Antikörper gezeigt werden.^{22;29;68} Zum anderen besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen auch TZR-unabhängige, NK-Zell-ähnliche

Mechanismen. So können über das intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 oder den NKG2D-Rezeptor für die Zytotoxizität wichtige Signale vermittelt werden.^{30;69} Ebenso führt eine niedrige Expression von HLA-Klasse I auf den Tumorzellen zu einer verstärkten Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen. Durch die damit für die Killer-inhibitory-Rezeptoren fehlenden Liganden, fällt auch das für die $\gamma\delta$ T-Zellen hemmende Signal weg (so genanntes „missing self“ Konzept).^{26;27}

MHC sind die Major Histocompatibility Complexes und bezeichnen genau genommen die Gene, auf denen die entsprechenden HLA-Proteine kodiert werden. Eine Abhängigkeit der Aktivierung oder des zytotoxischen Potentials der $\gamma\delta$ T-Zellen von der HLA-Klasse I der Tumorzellen konnte in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden (Tab. 21). Sowohl HLA-Klasse I⁻ Daudi Zellen, als auch HLA-Klasse I⁺ U-226 Zellen konnten lysiert werden, während sich die HLA-Klasse I⁺ Zelllinie THP1 anerg verhielt. Die Tumorzellen der Patienten 1 bis 5 exprimierten alle HLA-Klasse I und waren gegenüber der Lyse der $\gamma\delta$ T-Zellen empfindlich. Dies verdeutlicht ebenfalls, dass eine fehlende HLA-Klasse I Expression - neben anderen NK-Zell ähnlichen Mechanismen und neben dem V γ 9V δ 2-TZR - nur einen Baustein in einem Zusammenspiel aktivierender und inhibitorischer Signale für die Anti-Tumoraktivität darstellt.

Neben dem adoptiven Zelltransfer beruht der zweite prinzipielle Ansatz einer Immuntherapie auf einer direkten in vivo Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen. Für in vivo Versuche im Tiermodell eignen sich Primaten, die im Gegensatz zu Mäusen eine V γ 9V δ 2 T-Lymphozytenpopulation besitzen.⁷⁰ Durch Injektion von BrHPP und IL-2 konnte an Primaten erstmals eine Proliferation von V γ 9V δ 2 T-Zellen mit Produktion von T_H1-Zytokinen in vivo durch BrHPP nachgewiesen werden. Nach guten in vitro Ergebnissen erfolgen momentan Phase I Studien, die BrHPP zusammen mit IL-2 an Patienten mit Nierenzellkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom untersuchen.^{60;61}

Mit den Aminobisphosphonaten steht eine Reihe zugelassener und langjährig erprobter Medikamente zur Verfügung, die im Bereich therapeutisch verwendeter Dosierungen V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten aktivieren können.¹⁵

Hinweise auf eine immunmodulatorische Wirkung der Bisphosphonate ergaben sich bereits durch die Beobachtung einer des öfteren auftretenden Akut-Phase-Reaktion, im Sinne von Fieber, Myalgie, Lymphopenie und CRP-Anstieg, nach Verabreichung der Medikamente. In einer Untersuchung konnte im Falle einer Akut-Phase-Reaktion eine Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut nachgewiesen werden, die im Ausmaß auch mit der Schwere der Akut-Phase-Reaktion korrelierte.¹⁵ Als Ursache für die bei einem Teil der Patienten auftretenden Akut-Phase-Reaktion wurden erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine (v.a. TNF- α) beobachtet.^{71;72}

Die durch in vitro Untersuchungen und in Mausmodellen nachgewiesene Aktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegen Tumore vor allem hämatologischen Ursprungs wurde auch erstmals in einer Phase I-II Studie am Menschen bestätigt.⁷³ In dieser von Wilhelm, Kunzmann und Kollegen durchgeführten Pilotstudie wurden Patienten mit einem rezidierten oder refraktären Lymphom bzw. Plasmozytom eingeschlossen. Ein Teil der Patienten wurde zunächst in vitro auf die Stimulierbarkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen ließen sich die $\gamma\delta$ T-Zellen der untersuchten Lymphom- und Myelompatienten nur knapp in der Hälfte der Fälle durch Pamidronat und IL-2 in vitro stimulieren. Von 9 Patienten mit in vitro Aktivität konnte bei 5 Patienten auch eine selektive Aktivierung und Proliferation in vivo nach Behandlung mit Pamidronat und IL-2 nachgewiesen werden. Von diesen 5 Patienten mit einer in vivo Stimulation zeigte sich bei 3 Patienten mit einer partiellen Remission ein deutliches klinisches Ansprechen, bei einem weiteren eine temporäre Krankheitsstabilisation und bei einem ein Krankheitsprogress. Trotz dieser kleinen Patientenzahlen wurde in dieser klinischen Studie mit der engen Korrelation von einer in vivo Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen und dem Auftreten einer klinisch partiellen Remission nach Therapie mit einem Bisphosphonat und IL-2 erstmals ein signifikanter Anti-Lymphom bzw. Anti-Myelom Effekt am Menschen nachgewiesen. Als „proof of principle“ zeigt diese Studie eine auf $\gamma\delta$ T-Zellen basierende, wirksame Immuntherapie gegen Tumorerkrankungen am Menschen.

Zu enttäuschenden klinischen Ergebnissen nach Therapie mit Pamidronat und IL-2 – allerdings unter einem anderen Therapie-Regime – kam es in der erwähnten Studie, falls die $\gamma\delta$ T-Zellen bereits in vitro nicht proliferieren konnten, bzw. ein solches in vitro Screening gar nicht erfolgte. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von in vitro Analysen vor einer am Patienten beabsichtigten Therapie. Von den untersuchten Tumorpatienten zeigten die $\gamma\delta$ T-Zellen in dieser Studie im Gegensatz zu gesunden Probanden bereits in vitro in knapp der Hälfte der Fälle durch fehlende Aktivierung eine Anergie. In einer Studie mit Nierenzellkarzinom-Patienten konnten durch BrHPP bei 11 von 15 Patienten die $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgreich – annähernd an die Größenordnung gesunder Probanden – angereichert werden.⁴³ Zahlenmäßig stellt eine Anergie der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mancher Patienten einen deutlich limitierenden Faktor für eine Immuntherapie dar. Diese könnte krankheits- oder auch therapiebedingt sein, und eine Überwindung dieser Anergie ist eine zentrale Aufgabe für die Weiterentwicklung dieses Therapieansatzes.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde im Kapitel 4.1 eine für die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten effektive in vitro Methode demonstriert. Falls sich die $\gamma\delta$ T-Zellen des Patienten expandieren lassen, könnten weiterführend durch die Testung der Zytotoxizität dieser $\gamma\delta$ T-Zellen in vitro Rückschlüsse auf ein mögliches Ansprechen der Tumorzellen in vivo gezogen werden. Eine Korrelation von klinischem Ansprechen des Tumors mit in vitro Zytotoxizitätstestungen sollte für die Immuntherapie mit $\gamma\delta$ T-Zellen in weiteren Studien erfolgen, um somit in Zukunft möglichst viele prädiktive Werte für eine Immuntherapie zu gewinnen. Im Kapitel 4.5 dieser Arbeit wurde beispielhaft ein solches autologes Modell demonstriert, in dem zunächst die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen eines Patienten mit einem follikulären B-NHL durch ZOL/IL-2 und im Anschluss daran deren Zytotoxizität gegenüber den aus einem Lymphknoten gewonnenen, patienteneigenen Tumorzellen nachgewiesen wurden.

Aus den PBL des Patienten ließen sich – ausgehend von nur 2,1 % – die $\gamma\delta$ T-Zellen durch ZOL/IL-2 nach 13 Tagen auf 61,3 % der T-Zellen anreichern, wobei sich auch die absolute Zellzahl etwa verdoppelte (Abb. 32). Die $\gamma\delta$ T-

Zellen des Patienten konnten somit annähernd in die Größenordnung eines gesunden Spenders expandiert werden. Nach 13 Tagen lag auch mit knapp 40 % CD69⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen ein hoher Aktivierungsstatus vor (Abb. 33).

Interessanterweise waren unter den aus einem Lymphknoten aufbereiteten Lymphomzellen auch 6,3 % $\gamma\delta$ T-Lymphozyten nachzuweisen, die nahezu vollständig aktiviert zu 95,2 % CD69 exprimierten (Abb. 31). Dies veranschaulicht, dass $\gamma\delta$ T-Lymphozyten zu einem deutlichen Anteil in situ bereits aktiviert im Tumor vorliegen. Eine Untersuchung der Subpopulationen dieser tumorinfiltrierenden $\gamma\delta$ T-Zellen ergab ein Überwiegen der Zellen mit einer V δ 1-Kette gegenüber einer V δ 2-Kette in einem Verhältnis von etwa 1,8 : 1. Der Anteil der V δ 2⁺ T-Lymphozyten könnte möglicherweise aus der Blutzirkulation eingewandert sein, während die V δ 1⁺ T-Lymphozyten vom lokalen Gewebe abstammen könnten.

Im durchgeführten Zytotoxizitätsassay konnten die mit ZOL aus dem Blut des Patienten expandierten V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten mit bis zu 29,5 % einen deutlichen Anteil der autologen Lymphomzellen lysieren (Abb. 35).

Besonders Neoplasien hämatologischen Ursprungs eignen sich durch eine relativ einfache Gewinnung von Primärtumormaterial – durch periphere Blutentnahme, Knochenmarkspunktion oder Lymphknotenexstirpation – für eine in vitro-Testung und somit zur Anwendung von präklinischen Routineverfahren.

$\gamma\delta$ T-Zellen können über verschiedene Mechanismen ihr zytotoxisches Potential entwickeln. Während eine Reihe von Tumorzellen unabhängig vom TZR lysiert werden kann, ist hingegen die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber der Plasmozytomzelllinie RPMI-8226 oder gegenüber Daudi (Burkitt Lymphom) vom TZR abhängig.²⁴ Auch in der bereits erwähnten Studie mit einer Partialremission bei Lymphom- bzw. Myelompatienten nach Behandlung mit Pamidronat und IL-2 zeigte sich teils ein unmittelbar auftretender und teils ein protrahiert auftretender Therapieeffekt.⁷³ Für eine unmittelbare Zytotoxizität scheinen neben dem TZR die Fas-FasL-Interaktion und die Perforinfreisetzung wichtige Mechanismen zu sein.^{42;44} Protrahierte Anti-Tumoraktivität könnte wesentlich über Zytokinfreisetzung vermittelt sein. So kann IFN- γ über direkte

Inhibition des Tumorwachstums, durch Hemmung der Angiogenese oder auch durch Stimulation der Makrophagen auf vielseitige Weise eine Anti-Tumoraktivität entwickeln.⁷⁴

Um das Spektrum der gegenüber den $\gamma\delta$ T-Zellen empfindlichen Tumorarten zu erschließen, sind umfassende Zytotoxizitätstestungen und Untersuchungen beeinflussender Parameter notwendig. In Kapitel 4.4 dieser Arbeit wurde gezeigt, wie die myelomonozytäre Zelllinie THP1 im Gegensatz zu ihrer sonst vorliegenden Anergie nach Vorbehandlung mit einem Bisphosphonat (Zoledronat) trotz anschließendem mehrmaligen Waschen zur Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen führte und gegenüber deren zytotoxischem Potential empfindlich wurde (Abb. 28 bis 30). Neben THP1 wurden auch in einer Studie einer anderen Arbeitsgruppe mit Pamidronat inkubierte Zelllinien von beispielsweise Harnblasen-, Nieren-, Lungentumoren, sowie Melanom- und Osteosarkomzelllinien beschrieben, die ebenso nach mehrmaligem Waschen $\gamma\delta$ T-Zellen zur Proliferation und IFN- γ Produktion aktivierten, während nicht inkubierte Zellen kein aktivierendes Potential besaßen.⁵⁷ Durch die Vorbehandlung mit einem Bisphosphonat können nicht nur für die Anti-Tumoraktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen neue Targets gewonnen werden, sondern auch bereits sensible Tumorzellen noch stärker lysiert werden.⁵⁷

In dieser Arbeit (Kap. 4.5) wurden die monoklonalen B-Zellen des Patienten mit dem folliculären B-NHL mit 100 μ M ZOL über 11 Stunden inkubiert und anschließend dreimalig gewaschen. Das zytotoxische Potential der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten des Patienten gegenüber seinen Lymphomzellen wurde durch die ZOL-Vorbehandlung noch verstärkt, bzw. wurden die Lymphomzellen gegenüber dem lytischen Potential sensibler (Abb. 35).

Der therapeutische Serumspiegel von ZOL beträgt bei Tumorpatienten ungefähr 3 μ M.⁷⁵ Die Inkubation der THP1-Zelllinie (Kap. 4.4) oder der Lymphomzellen (Kap. 4.5) erfolgte mit 100 μ M, einer unphysiologisch hohen ZOL-Konzentration. Die meisten Studien verwendeten weit über dem therapeutischen Bereich liegende ABP-Konzentrationen. Das Potential einer Tumorsensibilisierung in vivo ist daher nur schwer abschätzbar.

Einerseits könnte ZOL bisher nicht identifizierte Moleküle auf der Tumorzelle induzieren, die wie stressinduzierte Antigene von den $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt werden könnten. Andererseits sprechen mittlerweile viele Studien für eine ZOL-Aufnahme in die Tumorzelle und eine folgende Enzymhemmung im Mevalonatstoffwechsel, wodurch $\gamma\delta$ T-Zell aktivierende Metabolite wie IPP akkumulieren.¹⁶

Bei der Identifizierung natürlicher Liganden konnten IPP und weitere intermediäre Metabolite des Mevalonatstoffwechsels – ein ubiquitärer und für die Zelle essentieller Stoffwechsel – festgestellt werden.⁹ Interessanterweise erfolgt die Wirkung der Aminobisphosphonate über die Hemmung eines Enzyms im klassischen Mevalonatstoffwechsel.¹⁷ Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von vorgeschalteten Metaboliten (u.a. IPP), welche $V\gamma 9V\delta 2$ T-Lymphozyten stimulieren können. Eigentlich zur Cholesterinsenkung verwendete Statine (z.B. Mevastatin) hemmen spezifisch das Schrittmacherenzym des Mevalonatstoffwechsels – die HMG-CoA-Reduktase – und verhindern somit auch eine Akkumulation der nachgeschalteten, $\gamma\delta$ T-Zellen stimulierenden Metabolite, wie etwa IPP.¹⁶ So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mevastatin die Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch eine Tumorzelllinie eines Mamma-Carcinoms (YMB-1) und eines Burkitt Lymphoms (Daudi) hemmt.¹⁶ Diese Hemmung durch Mevastatin entwickelte sich aber nicht in Gegenwart von IPP. Die Metaboliten des Mevalonatstoffwechsels sind nötig für die Cholesterolsynthese, das Zellwachstum und die Membranintegrität von Zellen, und Tumorzellen werden durch Hochregulation dieses Stoffwechsels ein besonderes Ziel für $\gamma\delta$ T-Zellen. Zusätzlich kann die Akkumulation der aktivierenden Metabolite in den Tumorzellen durch die Therapie mit Bisphosphonaten – wie ZOL – ein starkes Signal für die Immunantwort bedeuten.¹⁶

Die Metabolite des alternativen Mevalonatstoffwechsels stellen hochaffine Liganden für $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Lymphozyten dar, und IPP ist ein vergleichsweise mäßig aktiver Ligand.⁷⁶⁻⁷⁸ Bei den ubiquitären Metaboliten des

Mevalonatstoffwechsels könnte es sich somit auch um eine Kreuzreaktivität durch eine strukturelle Ähnlichkeit mit hochaffinen Liganden handeln.

Die Suche nach einem für den V γ 9V δ 2-TZR humanspezifischen zellulären Liganden, der im Rahmen einer malignen Transformation induziert wird, ist von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung einer auf $\gamma\delta$ T-Zellen beruhenden Immuntherapie maligner Erkrankungen.

Zusätzlich zu den Phosphoantigenen erkennt derselbe V γ 9V δ 2-TZR – wie erst kürzlich beschrieben – ebenfalls eine mitochondriale F1-ATPase assoziierte Struktur und auch Apolipoprotein A-I, die oft auf den Oberflächen von Tumorzellen exprimiert werden.⁷⁹ Die biologische Relevanz dieser neu beschriebenen Antigene für die $\gamma\delta$ T-Zellen ist noch unklar, bemerkenswert ist aber, dass ein einzeln definierter TZR – der V γ 9V δ 2-TZR – strukturell völlig verschiedene Antigene – wie Metabolite des Mevalonatstoffwechsels, F1-ATPase und Apolipoproteine – erkennen soll.

Eine wichtige Bedeutung für die Tumorerkennung wurde kürzlich auch für das intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) von Tumorzellen gezeigt, möglicherweise in Interaktion mit LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) von $\gamma\delta$ T-Zellen. In einer Studie induzierten Tumorzelllinien (nach Vorbehandlung mit Pamidronat) mit einem niedrigen ICAM-1 Anteil keine oder nur eine geringe $\gamma\delta$ T-Zell Antwort, während Zelllinien mit einem hohen Gehalt an ICAM-1 zu einer deutlichen Aktivierung führten.⁸⁰ Bei Plasmozytomzelllinien (U-226 und RPMI-8226) korrelierte deren Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 mit der Anti-Tumoraktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen. Eine Vorbehandlung der Plasmozytomzelllinien mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 verhinderte dagegen ihre Lyse durch die $\gamma\delta$ T-Zellen.⁸¹ Auch in Gentransferexperimenten mit ICAM-1 erhielten ursprünglich anerge Tumorzelllinien $\gamma\delta$ T-Zell-aktivierendes Potential.^{69;82}

Von spezieller Bedeutung für V γ 9V δ 2-T-Zellen ist auch der aktivierende NKG2D Rezeptor, der durch das von Tumorzellen exprimierte MICA/MICB und ULBP

aktiviert werden kann.^{30;31} Direkte Hinweise für eine Rolle von NKG2D in der Tumorkontrolle wurden für NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen im Maus-Modell mit Lymphomen⁸³, sowie für $\gamma\delta$ T-Zellen im Maus-Modell mit Hauttumoren gewonnen.⁸⁴ Beim Menschen sind die Hinweise für die Rolle von NKG2D in der Tumorüberwachung weniger direkt, aber NKG2D-vermittelte Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Tumorzellen konnte nachgewiesen werden.^{30;85} Interessanterweise dient NKG2D nicht nur als kostimulatorisches Signal, sondern kann auch direkt V γ 9V δ 2 T-Zellen ohne TZR-abhängigen Liganden aktivieren. Theoretisch könnte somit eine $\gamma\delta$ T-Zell vermittelte Immuntherapie auch gegenüber Tumorzellen ohne vorhandene $\gamma\delta$ TZR-Liganden möglich sein, indem der NKG2D Rezeptor als Ziel für die Aktivierung und Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen dienen würde.³⁵

NKG2D Liganden können allerdings auch proteolytisch von der Oberfläche von Tumorzellen abgespalten werden, und lösliche NKG2D Liganden inhibieren NK-Zellen und CD8 T-Zell-Funktion durch die Herunterregulation von NKG2D. Für lösliches MICA aus dem Serum von Tumorpatienten wurde vor kurzem eine Reduzierung der zytotoxischen Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt.⁸⁶ Immuntherapeutische Ansätze sollten somit auch in Erwägung ziehen, dass von Tumorzellen abstammende lösliche NKG2D Liganden die $\gamma\delta$ T-Zell Immunantwort beeinflussen könnten.

$\gamma\delta$ T-Zellen unterliegen als Teil des komplexen Immunsystems verschiedenen Regulationsmechanismen. In diesem Zusammenhang rückten auch CD4⁺ T-Regulatorzellen (T-reg.) zunehmend ins Interesse der Tumormunologie. Neben ihrer wichtigen Rolle in der Verhinderung von Autoimmunkrankheiten unterdrücken diese Zellen auch die Anti-Tumor Immunantwort des Körpers gegen Tumorzellen und könnten somit zum Scheitern einer Immuntherapie beitragen. In kürzlich veröffentlichten Studien wurde ein erhöhter Anteil CD4⁺CD25⁺ T-reg.-Zellen im Tumorgewebe oder im peripheren Blut bei malignen Erkrankungen der Lunge, der Brust, des Magens, der Eierstöcke, sowie bei malignen Melanomen und Lymphomen nachgewiesen.⁸⁷ Neben der Unterdrückung der Immunantwort bei in vitro Untersuchungen konnte in einer

Studie ein hoher Prozentsatz an T-reg.-Zellen bei Patienten mit Ovarialtumoren mit einer negativen Prognose korreliert werden.⁸⁸ Deren Funktion im unmittelbaren Tumormilieu und Strategien zur Unterdrückung von T-reg. Zellen – möglicherweise über Toll-like Rezeptoren – stehen im Interesse zur Nutzung des vollen Potentials einer $\gamma\delta$ T-Zell-Immuntherapie.⁸⁷

Die Anti-Tumoraktivität in vitro expandierter V γ 9V δ 2 T-Zellen nach adoptivem Transfer auf mit Tumorzellen versehene, immundefiziente Mäuse konnte im Tiermodell gezeigt werden.⁵⁹ In einer Studie mit Tumorpatienten war nach adoptivem Transfer aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen ein Marker für die Tumorprogression – das immunsuppressive saure Protein (immunsuppressive acidic protein) – deutlich rückläufig und eine Besserung der Lebensqualität konnte verzeichnet werden.⁸⁹

Beim Vorliegen einer autologen $\gamma\delta$ T-Zell-Anergie von Tumorpatienten stellt auch die Möglichkeit eines adoptiven Transfers von allogenen $\gamma\delta$ T-Zellen einen interessanten Ansatz dar. Nach Knochenmarkstransplantation konnte bereits für ALL-Patienten, die eine höhere $\gamma\delta$ T-Zellzahl entwickelten, ein niedrigeres Rezidivrisiko festgestellt werden.⁵⁶ Des Weiteren wurde auch die Anti-Tumoraktivität von V δ 1⁺ T-Zellen von Knochenmarksspendern gegenüber ALL-Blasten in vitro nachgewiesen, jedoch kam es zu keiner Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Gegenwart anderer HLA-inkompatibler Zellen.⁹⁰ Diese Beobachtungen deuten auf einen therapeutischen Effekt allogener $\gamma\delta$ T-Zellen ohne graft-versus-host Reaktion hin.

Die Wirksamkeit und gute Verträglichkeit einer direkten in vivo Stimulation von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten wurde in einer Pilotstudie mit einem Anti-Lymphom- bzw. Anti-Myelom-Effekt bis hin zu einer klinischen partiellen Remission eindrucksvoll gezeigt.⁷³

Eine solche direkte in vivo Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen könnte theoretisch auch noch mit einem adoptiven Zelltransfer kombiniert werden. Durch eine systemische Behandlung des Patienten mit einem Bisphosphonat könnten – neben der $\gamma\delta$ T-Zellen Aktivierung – auch Tumorantigene wie IPP induziert werden. Nachdem die Tumorzellen diese Tumorantigene exprimiert haben,

könnten die autologen, in vitro expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen zurücktransferiert werden und die Wirkung gegenüber den sensibilisierten Tumorzellen zusätzlich noch steigern.

Zur Weiterentwicklung dieser Therapieansätze bedarf es intensiver Forschung in vitro und in vivo. Mit dieser Arbeit wurde einerseits eine Methode mit einer starken in vitro Proliferation von $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen mit Ausbildung ihrer Anti-Tumoraktivität durch BrHPP und ZOL gezeigt. Andererseits konnte durch den Nachweis ihrer Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen von insgesamt 8 Leukämie-Patienten, sowie je einem Patienten mit einem Lymphom und einem Plasmozytom, das besondere Potential gegenüber hämatologischen Neoplasien unterstrichen werden.

6. Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für Tumorpatienten stellt die Immuntherapie mit $\gamma\delta$ T-Lymphozyten einen innovativen Ansatz dar. In vitro Zytotoxizität von $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten wurde gegen eine Vielzahl von Tumorzellen belegt. Mit den Aminobisphosphonaten steht eine Reihe zugelassener und langjährig erprobter Medikamente zur Verfügung, die im Bereich therapeutisch verwendeter Dosierungen $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten auch in vivo aktivieren können.¹⁵ Zudem ist Bromohydrin (BrHPP) als hochaffines synthetisches Phosphoantigen ein weiterer attraktiver Kandidat zur Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen und befindet sich am Menschen bereits in klinischen Studien.^{60;61} Strategien einer auf $\gamma\delta$ T-Zellen beruhenden Immuntherapie umfassen zum einen die in vitro Expansion von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mittels BrHPP oder Aminobisphosphonaten mit anschließendem Transfer, dem so genannten adoptiven Zelltransfer auf den Patienten. Zum anderen kann die Anti-Tumoraktivität von $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten auch direkt in vivo mittels Bisphosphonaten induziert werden, wie in einer Pilotstudie mit einem Anti-Lymphom- bzw. Anti-Myelom-Effekt bis hin zu einer klinischen partiellen Remission durch die Therapie mit einem Bisphosphonat (Pamidronat) und IL-2 eindrucksvoll gezeigt werden konnte.⁷³

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine effektive Methode zur in vitro Proliferation von $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen mit Ausbildung ihrer Anti-Tumoraktivität durch BrHPP und durch das Bisphosphonat Zoledronat in Anwesenheit von IL-2 gezeigt. Weitergehend konnte mit Zytotoxizitätstestungen – basierend auf der Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität – die zytolytische Aktivität dieser expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber den primären Tumorzellen von insgesamt 8 Leukämie-Patienten, sowie je einem Patienten mit einem Lymphom und einem Plasmozytom nachgewiesen werden. Dadurch wurde einerseits das besondere Potential der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten gegenüber hämatologischen Neoplasien unterstrichen, andererseits konnte ein Testverfahren gezeigt werden, mit dem das Spektrum empfindlicher Tumorzellen und Einflussgrößen

untersucht werden können. In einem Experiment wurde dargestellt, wie die myelomonozytäre Zelllinie THP1 im Gegensatz zu ihrer sonst vorliegenden Anergie nach Vorbehandlung mit Zoledronat durch $\gamma\delta$ T-Zellen lysiert werden konnte. In einem autologen Versuchsansatz konnte die Anti-Tumoraktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen eines Patienten mit der Diagnose eines follikuläres B-NHL durch Vorbehandlung der Lymphomzellen mit Zoledronat noch gesteigert werden.

$\gamma\delta$ T-Zellen unterliegen als Teil des komplexen Immunsystems verschiedenen Regulationsmechanismen, die auch manipuliert werden können. In vitro Testverfahren – wie in dieser Arbeit – sind die Voraussetzung für eine Grundlagenforschung, mit deren Hilfe man in Zukunft zu einer hoffnungsvollen, auf $\gamma\delta$ T-Zellen basierenden Immuntherapie maligner Erkrankungen gelangen könnte.

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Aminobisphosphonat
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BrHHP	Bromhydrinpyrophosphat
CD	cluster of differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fetal calf serum
FPP	Farnesylpyrophosphat
FSC	forward scatter
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
HLA	human leucocyte antigen
IE	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IPP	Isopentylpyrophosphat
KIR	killer inhibitory receptor
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	major histocompatibility complex
N-BP	Stickstoff enthaltendes Bisphosphonat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBL	periphere Blutlymphozyten
PE	Phycoerythrin
SSC	sideward scatter
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZOL	Zoledronat

Literaturverzeichnis

1. Davis ID. An overview of cancer immunotherapy. *Immunol.Cell Biol.* 2000;78:179-95.
2. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL *et al.* Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986;322:145-49.
3. Casorati G, De Libero G, Lanzavecchia A, Migone N. Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood. *J.Exp.Med.* 1989;170:1521-35.
4. Boismenu R, Havran WL. Gammadelta T cells in host defense and epithelial cell biology. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1998;86:121-33.
5. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu.Rev.Immunol.* 1993;11:637-85.
6. De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA *et al.* Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J.Immunol.* 2004;172:1637-45.
7. De Libero G. Sentinel function of broadly reactive human gamma delta T cells. *Immunol.Today* 1997;18:22-26.
8. Pfeffer K, Schoel B, Plesnila N, Lipford GB, Kromer S, Deusch K *et al.* A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells. *J.Immunol.* 1992;148:575-83.
9. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 1995;375:155-58.
10. Jomaa H, Feurle J, Luhs K, Kunzmann V, Tony HP, Herderich M *et al.* Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 1999;25:371-78.
11. Begley M, Gahan CG, Kollas AK, Hintz M, Hill C, Jomaa H *et al.* The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gammadelta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett.* 2004;561:99-104.
12. Espinosa E, Belmant C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagne F *et al.* Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a

- potent stimulator of human gamma delta T cells. *J.Biol.Chem.* 2001;276:18337-44.
13. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 2000;96:384-92.
 14. Dieli F, Gebbia N, Poccia F, Caccamo N, Montesano C, Fulfaro F *et al.* Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood* 2003;102:2310-11.
 15. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N.Engl.J.Med.* 1999;340:737-38.
 16. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J.Exp.Med.* 2003;197:163-68.
 17. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J.Bone Miner.Res.* 1998;13:581-89.
 18. Sturm E, Braakman E, Fisch P, Vreugdenhil RJ, Sondel P, Bolhuis RL. Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor-gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J.Immunol.* 1990;145:3202-08.
 19. Selin LK, Stewart S, Shen C, Mao HQ, Wilkins JA. Reactivity of gamma delta T cells induced by the tumour cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL heat shock proteins. *Scand.J.Immunol.* 1992;36:107-17.
 20. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR *et al.* Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity.* 1995;3:495-507.
 21. Allison TJ, Garboczi DN. Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Mol.Immunol.* 2002;38:1051-61.
 22. Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y, Bloom BR, Brenner MB, Band H. V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J.Immunol.* 1995;154:998-1006.
 23. Bukowski JF, Morita CT, Band H, Brenner MB. Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by gamma delta T cells. *J.Immunol.* 1998;161:286-93.

24. Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, Minato N. Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. *J.Immunol.* 2001;166:5508-14.
25. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat.Immunol.* 2001;2:293-99.
26. Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol.Rev.* 2002;188:9-21.
27. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-47.
28. Rothenfusser S, Buchwald A, Kock S, Ferrone S, Fisch P. Missing HLA class I expression on Daudi cells unveils cytotoxic and proliferative responses of human gammadelta T lymphocytes. *Cell Immunol.* 2002;215:32-44.
29. Sicard H, Al Saati T, Delsol G, Fournie JJ. Synthetic phosphoantigens enhance human Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphoma. *Mol.Med.* 2001;7:711-22.
30. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-29.
31. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 2001;14:123-33.
32. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;279:1737-40.
33. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R *et al.* Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* 2002;62:6178-86.
34. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG *et al.* Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003;102:1389-96.
35. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J.Immunol.* 2005;175:2144-51.

36. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect.Immun.* 1993;61:197-203.
37. Tsukaguchi K, de Lange B, Boom WH. Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alphabetaTCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra. *Cell Immunol.* 1999;194:12-20.
38. Wang L, Das H, Kamath A, Bukowski JF. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J.Immunol.* 2001;167:6195-201.
39. Cipriani B, Borsellino G, Poccia F, Placido R, Tramonti D, Bach S *et al.* Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood* 2000;95:39-47.
40. Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J.Immunol.* 1996;157:985-92.
41. Biswas P, Rovere P, De Filippi C, Heltai S, Smith C, Dagna L *et al.* Engagement of CD30 shapes the secretion of cytokines by human gamma delta T cells. *Eur.J.Immunol.* 2000;30:2172-80.
42. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS *et al.* Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J.Exp.Med.* 2000;191:937-48.
43. Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S *et al.* Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J.Immunol.* 2005;174:1338-47.
44. Li B, Bassiri H, Rossman MD, Kramer P, Eyuboglu AF, Torres M *et al.* Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J.Immunol.* 1998;161:1558-67.
45. De Libero G. Tissue distribution, antigen specificity and effector functions of gamma delta T cells in human diseases. *Springer Semin.Immunopathol.* 2000;22:219-38.
46. Li B, Rossman MD, Imir T, Oner-Eyuboglu AF, Lee CW, Biancaniello R *et al.* Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *J.Immunol.* 1996;157:4222-29.

47. Ueta C, Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Takashima T, Toba H, Kishimoto S. Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. *Infect.Immun.* 1994;62:5434-41.
48. Wallace M, Scharko AM, Pauza CD, Fisch P, Imaoka K, Kawabata S *et al.* Functional gamma delta T-lymphocyte defect associated with human immunodeficiency virus infections. *Mol.Med.* 1997;3:60-71.
49. Martini F, Urso R, Gioia C, De Felici A, Narciso P, Amendola A *et al.* gammadelta T-cell anergy in human immunodeficiency virus-infected persons with opportunistic infections and recovery after highly active antiretroviral therapy. *Immunology* 2000;100:481-86.
50. Gioia C, Agrati C, Casetti R, Cairo C, Borsellino G, Battistini L *et al.* Lack of CD27-CD45RA-V gamma 9V delta 2+ T cell effectors in immunocompromised hosts and during active pulmonary tuberculosis. *J.Immunol.* 2002;168:1484-89.
51. Poccia F, Gougeon ML, Agrati C, Montesano C, Martini F, Pauza CD *et al.* Innate T-cell immunity in HIV infection: the role of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes. *Curr.Mol.Med.* 2002;2:769-81.
52. Maeurer MJ, Martin D, Walter W, Liu K, Zitvogel L, Halusczyk K *et al.* Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J.Exp.Med.* 1996;183:1681-96.
53. Bank I, Book M, Huszar M, Baram Y, Schnirer I, Brenner H. V delta 2+ gamma delta T lymphocytes are cytotoxic to the MCF 7 breast carcinoma cell line and can be detected among the T cells that infiltrate breast tumors. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1993;67:17-24.
54. Schilbach KE, Geiselhart A, Wessels JT, Niethammer D, Handgretinger R. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J.Immunother.(1997.)* 2000;23:536-48.
55. Bensussan A, Lagabrielle JF, Castaigne S, Boisson N, Miclea JM, Benbunan M *et al.* Human CD3 gamma delta + activated lymphocytes exhibit killer activity in vitro against autologous leukemic cells. *Nouv.Rev.Fr.Hematol.* 1989;31:129-32.
56. Lamb LS, Jr., Henslee-Downey PJ, Parrish RS, Godder K, Thompson J, Lee C *et al.* Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J.Hematother.* 1996;5:503-09.
57. Kato Y, Tanaka Y, Miyagawa F, Yamashita S, Minato N. Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens. *J.Immunol.* 2001;167:5092-98.

58. Bubenik J. Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review). *Oncol.Rep.* 2003;10:2005-08.
59. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *J.Immunol.* 2004;173:6767-76.
60. Viey E, Laplace C, Escudier B. Peripheral gammadelta T-lymphocytes as an innovative tool in immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 2005;5:973-86.
61. Kunzmann V, Wilhelm M. Anti-lymphoma effect of gammadelta T cells. *Leuk.Lymphoma* 2005;46:671-80.
62. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003;102:200-06.
63. Wesch D, Marx S, Kabelitz D. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur.J.Immunol.* 1997;27:952-56.
64. Sato K, Kimura S, Segawa H, Yokota A, Matsumoto S, Kuroda J *et al.* Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int.J.Cancer* 2005;116:94-99.
65. Weidmann E, Brieger J, Jahn B, Hoelzer D, Bergmann L, Mitrou PS. Lactate dehydrogenase-release assay: a reliable, nonradioactive technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic activity against blasts from acute myelocytic leukemia. *Ann.Hematol.* 1995;70:153-58.
66. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J.Immunol.Methods* 1983;64:313-20.
67. Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N *et al.* CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J.Exp.Med.* 1991;174:1393-98.
68. Poccia F, Malkovsky M, Gougeon ML, Bonneville M, Lopez-Botet M, Fournie JJ *et al.* Gammadelta T cell activation or anergy during infections: the role of nonpeptidic TCR ligands and HLA class I molecules. *J.Leukoc.Biol.* 1997;62:287-91.
69. Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *J.Immunol.* 2003;170:3608-13.

70. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, Serraz C, Fournie JJ, Bonneville M *et al.* In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J.Immunol.* 2005;175:5471-80.
71. Gallacher SJ, Ralston SH, Patel U, Boyle IT. Side-effects of pamidronate. *Lancet* 1989;2:42-43.
72. Thiebaud D, Sauty A, Burckhardt P, Leuenberger P, Sitzler L, Green JR *et al.* An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcif.Tissue Int.* 1997;61:386-92.
73. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003;102:200-06.
74. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 1997;15:749-95.
75. Skerjanec A, Berenson J, Hsu C, Major P, Miller WH, Jr., Ravera C *et al.* The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. *J.Clin.Pharmacol.* 2003;43:154-62.
76. Belmant C, Espinosa E, Poupot R, Peyrat MA, Guiraud M, Poquet Y *et al.* 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *J.Biol.Chem.* 1999;274:32079-84.
77. Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK *et al.* Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2001;509:317-22.
78. Feurle J, Espinosa E, Eckstein S, Pont F, Kunzmann V, Fournie JJ *et al.* *Escherichia coli* produces phosphoantigens activating human gamma delta T cells. *J.Biol.Chem.* 2002;277:148-54.
79. Scotet E, Martinez LO, Grant E, Barbaras R, Jenö P, Guiraud M *et al.* Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity.* 2005;22:71-80.
80. Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *J.Immunol.* 2003;170:3608-13.
81. Uchida R, Ashihara E, Sato K, Kimura S, Kuroda J, Takeuchi M *et al.* Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007;354:613-18.

82. Uchida R, Ashihara E, Sato K, Kimura S, Kuroda J, Takeuchi M *et al.* Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007;354:613-18.
83. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;413:165-71.
84. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001;294:605-09.
85. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:6879-84.
86. Marten A, Lilienfeld-Toal M, Buchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int.J.Cancer* 2006;119:2359-65.
87. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr.Opin.Immunol.* 2007;19:217-23.
88. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat.Med.* 2004;10:942-49.
89. Ebina T, Fujimiya Y, Yamaguchi T, Ogama N, Sasaki H, Isono N *et al.* The use of BRM-activated killer cells in adoptive immunotherapy: a pilot study with nine advanced cancer patients. *Biotherapy* 1998;11:241-53.
90. Lamb LS, Jr., Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ *et al.* Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:601-06.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Volker Kunzmann und Prof. Dr. Martin Wilhelm. Die ausgezeichnete Betreuung, die inspirierende Zusammenarbeit und das entgegengebrachte Vertrauen in deren Arbeitsgruppe hat wesentlich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit Freude und Begeisterung erstellen konnte. PD Dr. Volker Kunzmann danke ich besonders für das jederzeit offene Ohr für meine Fragen und Probleme, für seine $\gamma\delta$ T-Zellen als Normalspender B, sowie für die schnelle und intensive Korrekturphase.

Herrn Prof. Dr. T. Herrmann danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferates.

Für die Möglichkeit, die Untersuchung an der Medizinischen Poliklinik Würzburg durchführen zu können, bedanke ich mich bei Prof. Dr. K. Wilms und Prof. Dr. H. Einsele.

Ein großes Dankeschön gilt allen wissenschaftlich technischen Mitarbeiterinnen des Immunbiologischen Labors für die Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Besonders erwähnen möchte ich: Karin Höhne, Dr. rer. nat. Susanne Eckstein, Martina Wiesler, Judith Engert, Rosemarie Otthol, meine Studienfreunde („die Jungs“), Markus Bessler und Michaela Greich.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Andreas Lindner
Geburtsdatum	03.12.1975
Geburtsort	Aschaffenburg
Heimatanschrift	Hohe-Wann-Str. 5, 97475 Zeil am Main
Telefon	0163-5533110
E-mail	lindi@gmx.de
Religion	röm.-katholisch

Werdegang

1982 – 1987	Besuch der Grund- und Hauptschule in Zeil am Main
1987 – 1996	Besuch des Regiomontanus-Gymnasiums in Haßfurt
1996 - 1997	Zvildienst im Rettungsdienst des BRK in Haßfurt
11/ 1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
WS 2001/02	Auslandssemester an der Universität Paris XIII – Léonard de Vinci, Frankreich
<i>Praktisches Jahr</i>	Pädiatrie am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden Chirurgie am Stadtspital Triemli, Zürich Innere Medizin, Strong Memorial Hospital, Rochester/N.Y., USA
11/ 2004	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt
01/2005 – 01/2007	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin an der Missionsärztlichen Klinik Würzburg
01/2007 – 04/2007	Diplom für Tropenmedizin und Hygiene an der London School for Hygiene and Tropical Medicine, Großbritannien
ab 08/2007	geplanter Einsatz mit Médecins Sans Frontières, Ärzte ohne Grenzen e.V.

Würzburg, den 29. Juni 2007

Andreas Lindner