

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

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Immunantwort bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Beverly Vanessa Katz
aus Frankfurt am Main**

Würzburg, Januar 2022



Referent: Prof. Dr. med. Volker Kunzmann
Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

Korreferent: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
Kinderklinik und Poliklinik Uniklinikum Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2022

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 IMMUNSYSTEM	1
1.2 T-LYMPHOZYTEN	4
1.3 $\alpha\beta$ T-LYMPHOZYTEN	5
1.4 $\gamma\delta$ T-LYMPHOZYTEN	6
1.5 BUTYROPHILIN BTN3A1	11
1.6 GASTROINTESTINALE TUMORE	15
1.7 FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNG	17
2. MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 ZELLKULTURMEDIEN UND PUFFER	18
2.1.2 REAGENZIEN UND STIMULANZIEN.....	19
2.1.3 CHEMIKALIEN	19
2.1.4 ANTIKÖRPER	20
2.1.5 GERÄTE	21
2.1.6 LABORBEDARF/-MATERIALIEN	22
2.1.7 PATIENTEN/ETHIK- UND TIERVERSUCHSVOTUM/HUMANE PRIMÄRZELLEN/ SPENDERZELLEN	22
2.2 METHODEN	23
2.2.1 DICHTEGradientenzentrifugation (FICOLL-GRADIENT).....	23
2.2.2 FACS ANALYSE	24
2.2.3 BESTIMMUNG DER ANZAHL VITALER ZELLEN	25
2.2.4 AKTIVIERUNG (CD69 EXPRESSION) UND PROLIFERATION VON $\gamma\delta$ T-ZELLEN	26
2.2.5 FÄRBUNG	27
2.2.6 STATISTISCHE ANALYSE.....	28
3. ERGEBNISSE	30
3.1 PATIENTEN- UND NORMALSPENDERKOLLEKTIV	30
3.2 AKTIVIERBARKEIT VON $V\gamma 9V\delta 2$ T-ZELLEN IM VERGLEICH NORMALSPENDER VS. TUMORPATIENTEN.....	32
3.3 PROLIFERATION VON $V\gamma 9V\delta 2$ T-ZELLEN IM VERGLEICH NORMALSPENDER VS. TUMORPATIENTEN.....	46
3.4 $V\gamma 9V\delta 2$ T-ZELL SUBSETS IM VERGLEICH NORMALSPENDER VS. TUMORPATIENTEN	62
3.5 WEITERE AKTIVIERUNGS-RELEVANTE OBERFLÄCHENANTIGENE AUF $V\gamma 9V\delta 2$ T-ZELL IM VERGLEICH NORMALSPENDER VS. TUMORPATIENTEN	69
4. DISKUSSION	89
5. ZUSAMMENFASSUNG	106

6. LITERATURVERZEICHNIS..... 107

Appendix

- I** Abkürzungsverzeichnis
- II** Abbildungsverzeichnis
- III** Tabellenverzeichnis
- IV** Danksagung
- V** Lebenslauf
- VI** Anhang

1. Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist ein seit über Millionen von Jahren entstandenes Abwehrsystem des Körpers zum Schutz vor Erregern sowie vor entarteten körpereigenen Zellen. Die Zellen des Immunsystems erkennen die Fremdkörper anhand von bestimmten Proteinmustern, sogenannten Antigenen.

Das Immunsystem kann in ein angeborenes (nicht-adaptives oder unspezifisches) und ein erworbenes (adaptives oder spezifisches) System unterteilt werden. Beide Teile des Systems sind aus einem zellulären Anteil und einem humoralen Anteil aufgebaut und über komplexe Mechanismen eng miteinander verknüpft, weshalb eine strikte Trennung schwer ist.

Die Immunzellen des Abwehrsystems sind Leukozyten. Sie zeichnen sich durch bestimmte Oberflächenmoleküle aus. Um diese Oberflächenproteine besser identifizieren zu können und die Zellen besser definieren und untereinander unterscheiden zu können, wurde die Nomenklatur Cluster of differentiation (CD) eingeführt (1,2). Jedes membrangebundene Protein erhält bei dieser Nomenklatur das Präfix CD sowie eine Nummer. Somit lassen sich die Zellen sowie ihre Unterklassen unterscheiden. Außerdem kann anhand der CD-Moleküle auch der Entwicklungsstand einer Zelle erkannt werden. Im Falle des Vorhandenseins eines CD-Moleküls wird dieses mit einem hochgestellten Plus markiert, im Falle des Nichtvorhandenseins mit einem hochgestellten Minus. So zum Beispiel besitzen zytotoxische T-Zellen die Kennzeichnung $CD4^-/CD8^+$ -T-Zellen.

Das angeborene, unspezifische Immunsystem besteht aus allgemeinen Abwehrmechanismen, um eingedrungene Fremdkörper abzuwehren, bis das spezifische Immunsystem arbeitet. Es ist demnach immer verfügbar, wirkt schnell und unabhängig von der Art des Antigens. Ihm zugehörig sind physikalische Barrieren, das

Komplementsystem und spezielle Abwehrzellen. Zu den Abwehrzellen gehören Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen sowie dendritische Zellen und Mastzellen. Diese erkennen auf eingedrungenen Pathogenen unspezifisch mithilfe bestimmter Rezeptoren, den Pattern Recognition Rezeptors (PRR) (3,4), bestimmte Oberflächenmuster sogenannte Pathogen-Associated Molecular Pattern, kurz PAMPS (5,6). Nach Erkennung der Pathogene durch die Abwehrzellen der angeborenen Immunabwehr, phagozitieren diese die Pathogene, töten sie direkt ab und/oder sezernieren bestimmte Zytokine und Chemokine. Beim erstmaligen Kontakt mit dem Pathogen beginnt also sofort eine Immunreaktion und Eliminierung des Pathogens, da für die angeborene Immunabwehr aufgrund der typischen und unveränderten molekularen Muster (PAMPS) keine spezifischen Rezeptoren (z.B. T-Zell-Rezeptoren) angepasst werden müssen. Die meisten Abwehrzellen können über sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplex Moleküle, engl. major histocompatibility complex (MHC), die auf jeder kernhaltigen körpereigenen Zelle vorhanden sind, zwischen fremd und eigen unterscheiden. Es gibt zwei Formen der MHC-Proteine; MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II. Die Präsentation der Antigene von Krankheitserregern durch die Abwehrzellen erfolgt meistens über diese Proteine. Die Abwehrzellen spielen demnach nicht nur für die angeborene Abwehr eine wichtige Rolle, in dem sie die Pathogene unspezifisch „bekämpfen“, sondern auch für die Aktivierung der erworbenen Abwehr durch Antigenpräsentation und Aktivierung durch sezernierte Botenstoffe (Zytokine und Chemokine). Die meisten der genannten Zellen der angeborenen Abwehr präsentieren Anteile der phagozytierten Erreger nach außen (über MHC) und können so andere Zellen aktivieren. Diese Zellen werden auch als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. Auch B-Lymphozyten, die zum adaptiven System gehören, dienen als Antigenpräsentierende Zellen. Die APZ können so zum einen naive T- und B-Lymphozyten im Knochenmark bzw. Thymus aktivieren zum anderen stimulieren sie Zellen des adaptiven Immunsystems, um spezifisch gegen die Pathogene zu wirken. Im humanen System werden die genannten MHC-Moleküle als Leukozytenantigene, abgekürzt HLA, bezeichnet. Das erworbene, spezifische Immunsystem hingegen muss sich erst im Laufe des Lebens entwickeln. Zu diesem System gehören B- und T-

Lymphozyten, die produzierten Antikörper sowie Makrophagen. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem besitzt das adaptive Immunsystem die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung. Dadurch wird bei erneuter Exposition mit dem gleichen Antigen eine effizientere und schneller eintretende Reaktion des Immunsystems induziert. Wichtig für das erworbene Immunsystem sind Lymphozyten. Zu ihnen gehören vier Zelltypen: B-Lymphozyten, $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, wobei natürliche Killerzellen hauptsächlich in der angeborenen Immunantwort und $\gamma\delta$ T-Zellen für beide Abwehrsysteme eine wichtigere Rolle spielen. Sie stellen demnach eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem dar. Die Lymphozyten erkennen hoch spezifische Oberflächenmerkmale auf Fremdkörpern oder einer entarteten Zelle, in den meisten Fällen nach Präsentation über MHC-Antigen-Komplexe und wehren demnach spezifisch ab. Wie oben beschrieben, werden T- und B-Zellen über antigenpräsentierende Zellen aktiviert und reagieren mit einer klonalen Expansion auf das spezifische Antigen. Eine wichtige und immer mehr in Vordergrund tretende Rolle im Immunsystem nehmen die $\gamma\delta$ T-Zellen ein. Aufgrund ihrer Stellung im Immunsystem als Schnittstelle beider Systeme, ihrer unterschiedlichen nicht MHC-Antigen-Komplex abhängigen Aktivierung und ihrer besonderen Aufgaben, erhalten diese Zellen immer mehr Beachtung und Interesse für mögliche Immuntherapien.

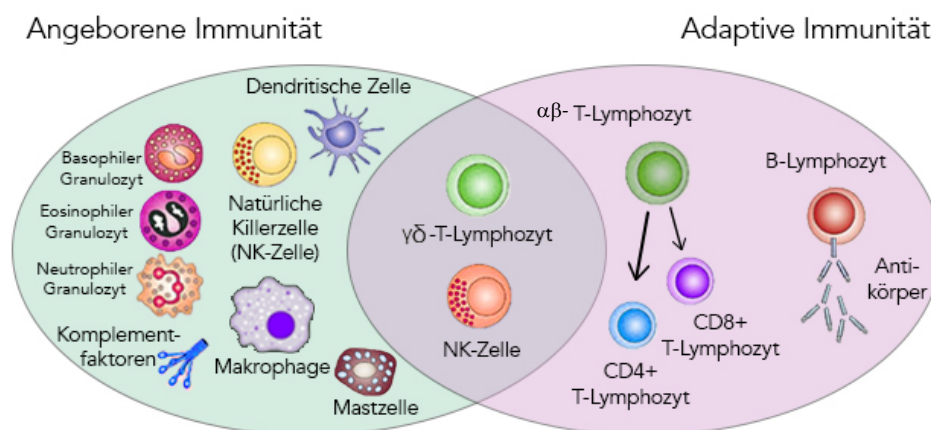


Abbildung 1: Darstellung der unterschiedlichen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Modifiziert nach Glen Darnoff (7).

1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten können abhängig ihres exprimierten T-Zell-Rezeptors (TZR) in $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zellen unterteilt werden. Sie spielen, wie andere Immunzellen, eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, zum einen in der Eliminierung körperfremder oder entarteter körpereigener Zellen, zum anderen in der Regulation der humoralen Immunantwort.

T-Lymphozyten entstammen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Hier entwickeln sich die Stammzellen zu sogenannten Progenitorzellen oder Pro-T-Zellen und besiedeln zur weiteren Ausdifferenzierung den Thymus. Im Thymus verlieren die Progenitorzellen das Potential sich zu B-Lymphozyten oder Natürlichen Killerzellen zu entwickeln. Die Vorläuferzellen im Thymus werden auch als Thymozyten bezeichnet. Abhängig entlang welchem Signalweg sich die Thymozyten bewegen, finden im Thymus unterschiedliche Differenzierungsstadien und Reifungsprozesse statt, die zur Entwicklung von naiven T-Zellen führen. So gehen, je nach Signalweg, entweder $\gamma\delta$ oder $\alpha\beta$ T-Zellen hervor (8,9). Während der Reifung im Thymus findet die Ausbildung des antigenerkennenden T-Zell-Rezeptors, sowie die Entwicklung der typischen Oberflächenmoleküle statt. Anhand des Signalmoleküls CD3 und der Moleküle CD4 und CD8 können die T-Lymphozyten charakterisiert werden. Im Verlauf ihrer Entwicklung ändern sich diese Oberflächenmoleküle. Zu Beginn, als sogenannte Progenitorzellen, sind sie negativ für CD4 und CD8 und werden auch als „Doppelt Negativ“ (DN, $CD4^-CD8^-$) bezeichnet.

Abhängig davon welcher TZR an der Oberfläche der Thymozyten ausgebildet wird ($\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$) unterscheiden sich die Reifungsprozesse bis zur Entwicklung der naiven T-Zellen. Bei dem antigenerkennenden TZR handelt es sich um ein Protein-Heterodimer, bei dem entweder eine α - mit einer β -Kette oder eine γ - mit einer δ -Kette kombiniert werden. Dieser entsteht durch somatische Rekombination (V-(D)-J-Rekombination) (10). Hierbei handelt es sich um einen genetischen Umlagerungsprozess an der DNA, der für die Variabilität der T-Zell-Rezeptoren und den von den B-Zellen gebildeten

Antikörper sorgt. So wird die Erkennung einer Vielzahl von Antigenen ermöglicht. Beide T-Zellrezeptorarten sind mit dem CD3-Komplex assoziiert.

Bei der Entstehung der $\gamma\delta$ T-Zellen werden beide Ketten des Heterodimers im DN Stadium beginnend hergestellt, bei den $\alpha\beta$ T-Zellen hingegen wird zunächst die β -Kette und anschließend die α -Kette ausgebildet. Die $\gamma\delta$ T-Zellen verbleiben im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Zellen im DN Stadium und durchlaufen nicht, wie diese, das doppelt positive Reifestadium (DP), bei dem die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 beide auf der Zelloberfläche der $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert werden (11). Demnach finden vom doppelt negativen (DN) Stadium ausgehend unterschiedliche Signalwege statt (12).

Die weiteren Reifungsprozesse der $\alpha\beta$ T-Zellen unterliegen einer strengen Kontrolle. Eine wichtige Voraussetzung ist die Interaktion mit den MHC-Molekülen der Thymuszellen (positive Selektion) und die Aufspaltung in zwei „einfach positive“ Populationen, entweder $CD4^+$ oder $CD8^+$ Thymozyten. Um Autoimmunitäten zu verhindern, kommt es zur Apoptose von ca. 98% der unreifen Lymphozyten, deren TZR mit hoher Affinität gegen körpereigene Antigene gerichtet ist (negative Selektion) (13,14). Das Ergebnis nach durchlaufener Differenzierung sind selbsttolerante $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. $\gamma\delta$ T-Zellen überspringen dieses DP Reifestadium und haben ihren TZR bereits gegen Ende des DN Stadiums komplett ausgebildet.

1.3 $\alpha\beta$ T-Lymphozyten

Zum größten Teil des peripheren T-Zell Pools gehören die $\alpha\beta$ T-Lymphozyten. Sie sind Vermittler des adaptiven Immunsystems und reagieren mit klonaler Expansion spezifisch auf durch APZ präsentierte Antigene. $\alpha\beta$ T-Lymphozyten erkennen Antigene in Form kurzer, prozessierter Peptide, die an MHC-Klasse I- oder Klasse II-Moleküle gebunden sind (15). Sie sind demnach im Gegensatz zu den $\gamma\delta$ T-Zellen, auf die später näher eingegangen wird, MHC abhängig und benötigen zur Aktivierung eine Antigenprozessierung und MHC-Komplex-Präsentation (16,17). MHC-Klasse I- Liganden warnen das Immunsystem vor aktiven intrazellulären Infektionen und zielen auf die

Zerstörung infizierter Zellen ab. MHC-Klasse II-Liganden dienen der Bekämpfung extrazellulärer Infektionen. Entsprechend dieser Dichotomie bestehen reife $\alpha\beta$ T-Zellen aus zwei Linien, deren Antigenerkennung sich entweder auf MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II assoziierte Peptide konzentriert und deren Effektorfunktion auf dieses Erkennungsmuster abgestimmt ist. Diese Untergruppen werden anhand ihrer Oberflächenexpression von sogenannten Co-Rezeptoren definiert (18,19). Es handelt sich bei diesen Co-Rezeptoren um die CD4- oder CD8- Oberflächenmoleküle, die kooperativ zusammen mit dem TZR einer T-Zelle MHC-Klasse I- bzw. Klasse II-Liganden erkennen. Somit haben diese Co-Rezeptoren eine Bindungseigenschaft, die mit der des jeweiligen TZRs übereinstimmt. Je nach Oberflächenmolekül und dementsprechend auch deren Effektorfunktion werden die Zellen als Helfer- oder regulatorische CD4⁺ T-Zellen oder zytotoxische CD8⁺ T-Zellen bezeichnet. CD4⁺ T-Zellen setzen in erster Linie Zytokine frei und stimulieren dadurch andere Immunzellen, wie Makrophagen, Granulozyten und B-Lymphozyten, zytotoxische CD8⁺ T-Zellen töten Zielzellen direkt ab. Die Aufrechterhaltung der richtigen Anzahl und des richtigen Verhältnisses von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist für eine optimale Immunabwehr unerlässlich.

1.4 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

$\gamma\delta$ T-Lymphozyten sind CD3⁺ T Zellen, die einen charakteristischen T-Zell-Rezeptor (TZR) besitzen, der aus einer γ -Kette und einer δ -Kette zusammengesetzt ist. Der $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor wurde 1986 identifiziert und erstmals als zweite Form des TZR, neben dem $\alpha\beta$ TZR, beschrieben (20).

$\gamma\delta$ T-Lymphozyten stellen beim Menschen, im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, eine viel seltenere Gruppe des T-Zellpools dar. Trotz einiger Gemeinsamkeiten mit den $\alpha\beta$ -Zellen, wie beispielsweise die Regulation der Immunantwort, die Zytotoxizität oder Sekretion von Zytokinen bestehen interessante Unterschiede zwischen diesen beiden Zellpopulationen. Beim erwachsenen, gesunden Menschen machen $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen 1-5% der im Blut zirkulierenden T-Zellen aus (21). Im Vergleich dazu finden sich an Grenzflächen wie Haut oder Darmschleimhaut hingegen deutlich mehr $\gamma\delta$ T-Zellen.

So gehören ungefähr 20% der intraepithelialen T-Zellen der Darmschleimhaut zu den $\gamma\delta$ T-Zellen (22).

Beim Menschen ist es möglich $\gamma\delta$ T-Zellen, je nach Zusammensetzung ihres TZR, in Subgruppen zu unterteilen. Es werden V δ 2 und Non-V δ 2 T-Zellen unterschieden. Die größte dieser peripheren $\gamma\delta$ T-Zell-Subgruppe trägt einen heterodimeren TZR, der aus einer V δ 2-Kette besteht und an eine V γ 9-Kette gekoppelt ist (23–25). Diese Subgruppe stellt im menschlichen peripheren Blut mit über 80% der gesamten $\gamma\delta$ T-Zellen die Mehrheit dar (21,26,27). Trotz theoretisch hoher kombinatorischer Vielfalt (28), paart sich die V δ 2-Kette bevorzugt mit der V γ 9-Kette (29). Diese Zellsubpopulation wird aufgrund ihrer Zusammensetzung als V γ 9V δ 2 T-Zelle bezeichnet (30) und gilt als einer der am besten untersuchten T-Zellsubgruppe beim Menschen (31). Sie sind für Menschen und die meisten nicht-menschlichen Primaten einzigartig.

Die Non-V δ 2 T-Zellengruppen bestehen meist aus V δ 1, seltener V δ 3 und V δ 5, und können hauptsächlich in Epithelgewebe (z.B. Epidermis), Leber, Milz, Lymphknoten und Thymusdrüsen nachgewiesen werden (32).

$\gamma\delta$ T-Zellen spielen eine frühe und wesentliche Rolle bei der Erkennung eingedrungener Krankheitserreger. So können sich V γ 9V δ 2 T-Zellen bei Infektionen mit bestimmten Mikroben, einschließlich bakterieller Erreger wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* sowie Parasiten wie z.B. *Plasmodium falciparum* auf bis zu 50% der gesamten Blut T-Zellzahl erweitern (23,33). Darüber hinaus zeigen V γ 9V δ 2 T-Zellen eine ähnliche Reaktivität gegenüber bestimmten Arten von Krebszellen, wodurch das Interesse an diesen Zellen für die Verwendung zur Krebsimmuntherapie zunimmt (34). $\gamma\delta$ T-Zellen können als Vermittler des angeborenen und des adaptiven Immunsystems angesehen werden und kombinieren diese beiden. Fähigkeiten, die für einen angeborenen Phänotyp sprechen, sind antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die Fähigkeit Phagozytose zu vermitteln sowie ohne vorherige Differenzierung schnell auf pathogenspezifische Antigene zu reagieren (28). Sie sind in der Lage, eine Vielzahl von Zytokinen zu sekretieren (35,36) und durch Induktion von Apoptose und/oder Zytolyse direkt abzutöten (35). Außerdem exprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen

neben dem TZR auch Rezeptoren der angeborenen Immunität, wie zum Beispiel den NKG2D-Rezeptor, der auch auf Natürlichen Killerzellen gefunden wird und den zu den PAMPs gehörenden Toll-like Rezeptor (TLR). Über NKG2D Rezeptoren können Membranproteine wie MIC-A und MIC-B erkannt werden, die auf körpereigenen Zellen durch Stress hochreguliert werden. Diese Moleküle werden auch auf Tumorzellen exprimiert und können unter anderem auf diesem Weg von $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt werden. (37,38). Ihre Fähigkeit der somatischen Rekombination (V-(D)-J-Rekombination) der T-Zell-Rezeptorgene und die Fähigkeit einer Gedächtnisbildung stellen Merkmale des adaptiven Immunsystems dar (39).

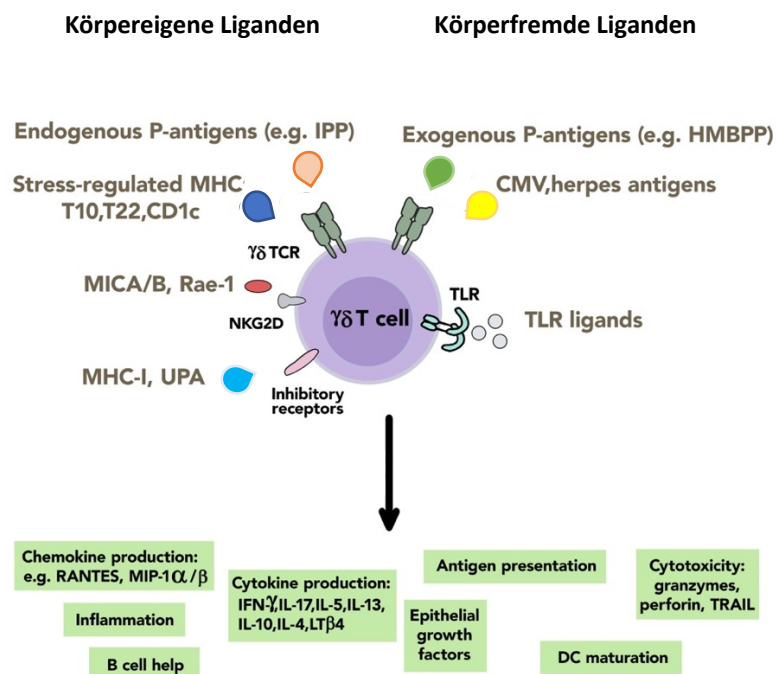


Abbildung 2: Darstellung unterschiedlicher Rezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Zellen und deren passenden Liganden (körpereigene und körperfremde) die zur Auslösung der dargestellten Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen führen. Modifiziert nach Adrian C. Hayday (36).

Im Unterschied zu $\alpha\beta$ T-Zellen reagieren $\gamma\delta$ T-Zellen direkt auf Proteine und Nicht-Peptid-Antigene (16) und sind nicht auf über MHC-präsentierte Peptide beschränkt (40). Sie benötigen demnach keine Antigenprozessierung und Antigenpräsentation über einen MHC-Komplex (16,17).

Als Schlüsselindikatoren der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-Aktivierung werden kleine pyrophosphathaltige Metabolite, die sogenannten Phosphoantigene (pAgs) beschrieben. Sie stammen aus Mikroben oder stellen endogene Zwischenprodukte dar, die sich in viral infizierten Zellen oder transformierten Zellen anreichern (23,24,41,42). In vitro Versuche, die auf der Inkubation von peripheren Lymphozyten mit mikrobakteriellen Lysaten beruhen, haben die Expansion von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch diese Phosphoantigene nachgewiesen (43). Eine Vielzahl von pAgs sind natürlich vorkommende Prenylpyrophosphate (41), wie zum Beispiel Isopentenylpyrophosphat (IPP) aus dem eukaryotischen Mevalonatweg sowie 4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enylpyrophosphat (HMBPP) aus dem mikrobiellen Nicht-Mevalonatweg (auch als MEP oder DOX-P bezeichnet) (44).

HMBPP ist ein essentieller Metabolit in den meisten pathogenen Bakterien, einschließlich *Mycobacterium tuberculosis* und Malariaparasiten, fehlt jedoch im menschlichen Wirt und ist daher für den Menschen ein körperfremdes Pyrophosphat. Ein wichtiger endogener Metabolit stellt das Isopentenylpyrophosphat (IPP), ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese aus dem Isoprenoid-Mevalonatweg, dar. In verschiedenen Arten von Tumorzellen führt eine Dysregulation dieses Mevalonatweges zu einer intrazellulären Akkumulation von IPP (34). Diese Akkumulation kann durch eine Hochregulation des Gatekeeper-Enzyms 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMGCR) (45) und anderer Mevalonatweg-Enzyme (46) erklärt werden. Die entstehenden Mevalonatwegprodukte wirken unterstützend auf das Überleben bösartiger Tumorzellen, da das Überleben und Wachstum von Krebszellen mit spezifischen metabolischen Veränderungen verbunden ist (47). Ein veränderter Glukosestoffwechsel oder ein veränderter Lipidstoffwechsel, durch die oben beschriebene Dysregulation, beeinflussen den Tumorstoffwechsel. Dementsprechend können $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen normale und transformierte Zellen aufgrund ihres metabolischen Phänotyps unterscheiden, insbesondere über die Überproduktion von pAgs, die durch die Isoprenoidbiosynthese in Tumorzellen entsteht. Die mikrobiellen Metabolite, die aus dem MEP Weg produziert werden, sind effizienter zur

Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen als das aus dem Mevalonatweg abgeleitete IPP (48–50).

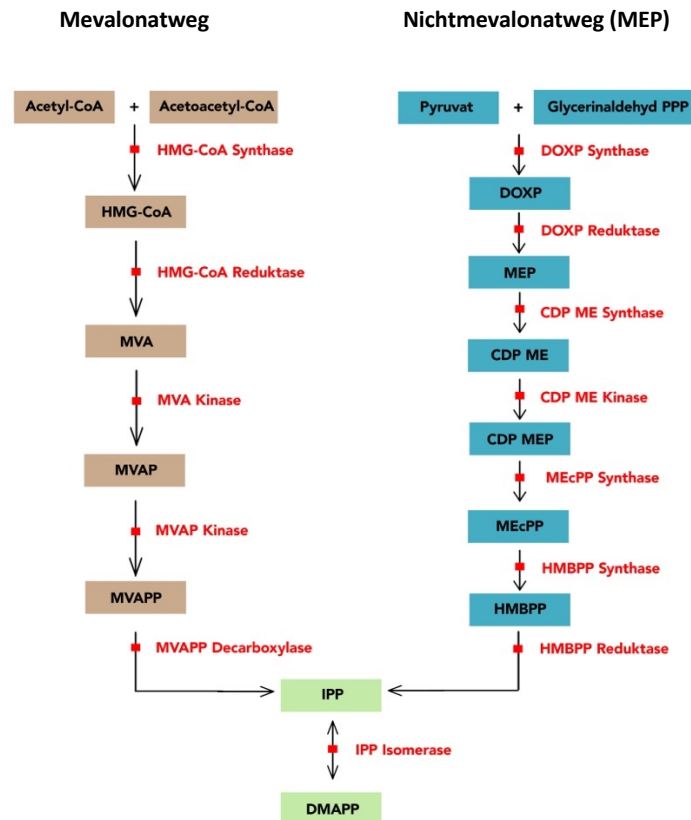


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mevalonatwegs und des Nichtmevalonatwegs.

PAGs können als primäre Auslöser der $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung betrachtet werden. T-Zellen können aber auch, wie bereits erwähnt, über (Co)Rezeptoren auf andere Antigene und Liganden reagieren (51).

Die endogene Produktion von Pyrophosphaten kann interessanterweise auch pharmakologisch beeinflusst werden. Aminobisphosphonate (n-BPs) wie beispielweise Zoledronat werden in der Tumorthherapie bei Knochenmetastasen und aufgrund ihrer Wirkung auf die Knochenresorption bei Osteoporose eingesetzt (34). Außerdem hemmen Aminobisphosphonate das Enzym Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS), welches IPP weiter zu Cholesterin verarbeitet. Über diese Hemmung kommt es zu einer intrazellulären IPP Anreicherung und in Folge dessen zu einer $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung (52). Demzufolge stimulieren n-BPs die $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung. Eine weitere Beeinflussung der

$\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung erfolgt über Statine. Statine inhibieren das Enzym HMGCR und reduzieren über dessen Hemmung die pAg-Synthese und somit auch die $V\gamma9V\delta2$ T-Zell-Aktivierung (53). Dementsprechend beeinflussen pharmakologische Mevalonatweg-Inhibitoren, welche die IPP Synthese hochregulieren (z.B. Aminobisphosphonate) oder runterregulieren (z.B. Statine), die $V\gamma9V\delta2$ T-Zell-Aktivierung (54,55).

Trotz der Charakterisierung zahlreicher natürlicher und synthetischer pAgs ist der Mechanismus des einzigartigen und spezifischen Aktivierungsprozesses der $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen durch pAgs noch wenig verstanden. Die Aktivierung ist sowohl TZR- als auch Zell-zu-Zell-Kontakt-abhängig. Außerdem haben Ergebnisse früherer Studien einen Schlüsselbeitrag von membranassoziierten Molekülen nahegelegt. Die jüngste Identifizierung der Butyrophilin (BTN)-Moleküle CD277/BTN3A, genauer gesagt ihrer BTN3A1-Isoform als Pflichtmoleküle bei der pAg-induzierten $V\gamma9V\delta2$ T-Zell-Aktivierung, eröffnet wichtige Möglichkeiten für weitere Forschung und genaueres Verständnis auf diesem Gebiet (31).

1.5 Butyrophilin BTN3A1

Wie zuvor beschrieben erkennen menschliche $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen Tumorzellen und mikrobielle Infektionen durch pAgs. Als Schlüssel der pAg-vermittelten Aktivierung von $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen wurde die sogenannte Butyrophilin 3A Proteinfamilie (BTN3A, oder CD277), vor allem das BTN3A1 Protein, beschrieben. Arbeiten unterschiedlicher Gruppen haben die zwingende Rolle dieses Proteins bei der antigenen Aktivierung von $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen bestätigt (25,56–59). Diese Erkenntnis stellt einen bahnbrechenden Schritt zum besseren Verständnis des besonderen Aktivierungsprozesses dar.

Butyrophiline stellen eine Gruppe von B7-verwandten Proteinen dar und gehören zur Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie. Beim Menschen befinden sich die BTN Gene (>10) im telomeren Teil nahe der HLA-Klasse-I-Region des Chromosom 6p (60).

Die BTN- Moleküle werden in drei Unterfamilien unterteilt: BTN, BTN2 und BTN3. Die BTN3 Unterfamilie wird wiederum selbst in drei Isoformen unterteilt: BTN3A1, BTN3A2 und BTN3A3 (60,61).

Der Aufbau der drei BTN3A- Isoformen weist für deren extrazelluläre Domäne eine hohe strukturelle Homologie (>95%) auf. Diese besteht bei allen drei Isoformen aus zwei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, einer membran-proximalen IgC- und einer N-terminalen IgV-Domäne (siehe Abb. 4) (60). Dahingegen exprimieren jedoch nur die BTN3A1 und BTN3A3 Isoformen einen intrazellulären Teil, der als B30.2 Domäne bezeichnet wird (62).

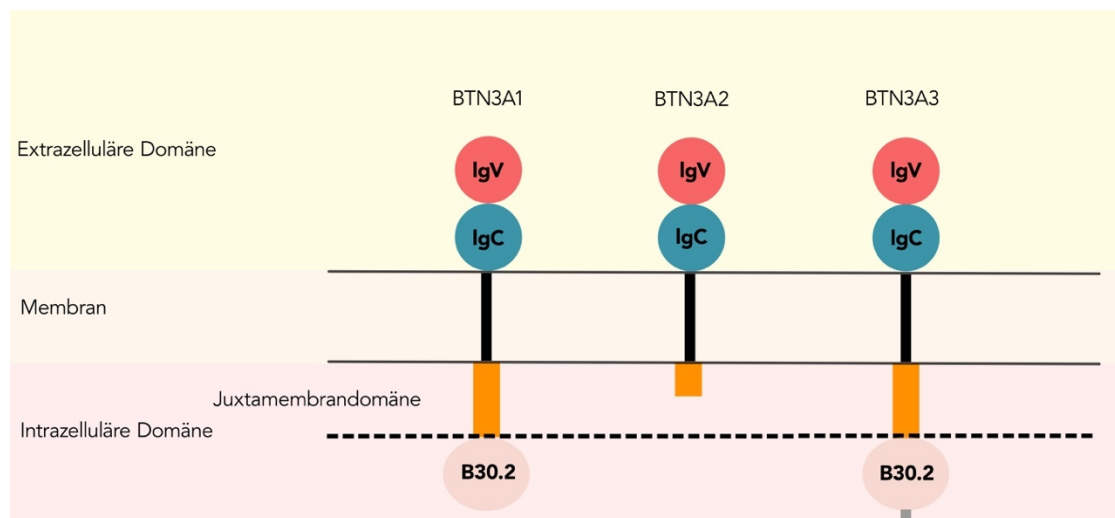


Abbildung 4: Die Proteine der BTN3A-Familie. Sie besitzen eine strukturelle Homologie. Sie weisen eine membran-proximale IgC- und eine N-terminale IgV-Domäne aufweisen. Sie sind über eine Transmembranstruktur (schwarz) mit einem intrazellulären Teil verbunden. Die Submembranregion (orange) repräsentiert die Juxtamembrandomäne (JTM). BTN3A1 und BTN3A3, jedoch nicht BTN3A2, besitzen eine intrazelluläre B30.2-Domäne. Die BTN3A3-Isoform verfügt über eine zusätzliche C-terminalen Erweiterung (grau). Modifiziert nach Boutin et al. © 2018 Boutin and Scotet (63).

Die Isoform BTN3A1 ist an der Vermittlung und Regulation der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellantwort durch Pyrophosphate unerlässlich beteiligt (56,58,59).

Der exprimierte intrazelluläre Teil der BTN3A1 Isoform hat eine charakteristische Aminosäuresequenz bestehend aus PRY/SPRY (62). Wichtiges Merkmal für die pAg Bindungsstelle der intrazellulären BTN3A1-B30.2 Domäne ist eine hoch positive

Ladungstasche, die durch basische Reste wie Arginin, Histidin und Lysin gebildet wird. Diese positiv geladene Tasche ist ein idealer Bereich für die Bindung des negativ geladenen Pyrophosphats (56,64). Die beiden andere Isoformen der Butyrophilin 3A Familie spielen für die V γ 9V δ 2 T-Zell Aktivierung eine eher untergeordnete Rolle.

Als Grund für die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Bindung von pAg trotz B30.2 Domäne bei BTN3A1 und BTN3A3 ergab sich ein Aminosäureunterschied zwischen diesen Isoformen innerhalb der sogenannten Bindungstasche der B30.2 Domäne. Ein einzelner Aminosäureunterschied in Position 381 innerhalb der Bindungstasche zeigt sich: ein Histidin in BTN3A1 und ein Arginin in BTN3A3. Dies wurde durch Austausch dieser einzelnen Aminosäuren zwischen den Domänen jeder Isoform nachgewiesen, und so die Bindungs-als auch funktionelle Fähigkeit V γ 9V δ 2 T Zellen durch pAg zu stimulieren, übertragen bzw. genommen (56,64). BTN3A2 fehlt die intrazelluläre Domäne und somit die positiv geladenen Bindungstasche komplett. Strukturelle, biochemische und funktionelle Assays zeigen, dass diese positiv geladene Bindungstasche mit der Aminosäure Histidin für die Bindung von pAg an BTN3A1 B30.2 und deren V γ 9V δ 2-stimulierende Aktivität erforderlich ist. Diese Beobachtungen wurden auch durch andere Forschungsgruppen (57,65) bestätigt.

Im Laufe der letzten Jahre, seit Beschreibung der obligatorischen Mitwirkung von BTN3A1, haben unterschiedliche Autoren/Gruppen widersprüchliche Meinungen und Modelle bezüglich des Wirkmechanismus vorgeschlagen und beschrieben.

Umstrittene Meinungen hat beispielsweise die Frage aufgeworfen, ob Pyrophosphate an die extrazelluläre Domäne oder die intrazelluläre Domäne des BTN3A1 Moleküls binden oder beides. Vavassori et al. schlugen BTN3A1 als „klassisches“ Antigen-präsentierendes Molekül für pAg vor. In diesem Modell beschrieben sie eine direkte Bindung des pAgs an eine flache Furche in der extrazellulären Domäne des BTN3A1, welches als stabiler Komplex dann direkt interagiert und den V γ 9V δ 2 TZR stimuliert (58). Andere Modelle schlugen eine direkte Bindung des pAgs an die intrazelluläre B30.2 Domäne vor (56,57). Für dieses Modell sprechen Domänenaustausch und/oder Mutationsexperimente, die darauf hinweisen, dass BTNA31, dessen intrazelluläre

Domäne B30.2 fehlt oder der eine BTN3A3-B30.2 Domäne exprimiert, keine effiziente durch pAg induzierte T Zellstimulation auslöst. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass chimäre BTN3A3 Moleküle, die die B30.2 Domäne von BTN3A1 exprimieren, eine effiziente pAg-vermittelte T Zellantwort auslösen (56,57).

Mittels weiterer Versuche unterschiedlicher Gruppen, wie beispielsweise die von Gu et al., distanzierte man sich von Vavassoris Modell und bestätigte, dass die intrazelluläre B30.2 Domäne von BTN3A1 eine entscheidende Rolle in der pAg Erkennung/Bindung spielt (66). Dafür spricht auch, dass Mutationen der B30.2 Domäne zu einem Abbruch der $V\gamma 9V\delta 2$ T Zell-Aktivität führen, es jedoch bei Veränderungen der extrazellulären Domäne zu keinem Abbruch kommt (64).

Gu et al. untersuchten die Auswirkungen der pAg-Bindung an die intrazelluläre Domäne B30.2 von BTN3A1 mittels NMR-Spektrometrie und Molekulardynamik (MD)-Simulationen. Unter Verwendung eines intrazellulären Domänenmodells mit voller Länge von BTN3A1 konnten sie eine Bindung an die intrazelluläre Domäne bestätigen und feststellen, dass die pAg-Bindung eine Konformationsänderung der BTN3A1-B30.2 Domäne induziert (66). Der Beitrag weiterer Teile des BTN3A1 Moleküls, die sogenannte Juxtamembrandomäne (JTM) wurden zusätzlich sorgfältig analysiert. Hsiao et al. beispielsweise konnten zeigen, dass die Bindung von pAg an die intrazelluläre Domäne nicht nur Konformationsänderungen an dieser induziert, sondern auch an der JTM-Domäne, was auch durch weitere unabhängige Studien bestätigt wurde (65–67).

All dies lässt vermuten, dass es sich bei der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellaktivierung um einen komplex regulierten Mechanismus handelt. Die Wirkungsweise von BTN3A1 und der pAg-Moleküle zur Auslösung einer spezifischen antigenen Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ist bislang jedoch immer noch nicht vollständig geklärt. Trotz großer Durchbrüche im Verständnis des Mechanismus bleiben einige Fragen, wie beispielsweise die Wahrnehmung der möglichen Konformationsänderungen durch $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen vonstattengeht, weiterhin unbeantwortet.

Einige Autoren vermuten, dass Modifikationen der extrazelluläre Domäne des BTN3A1 Moleküls auftreten und dadurch die Membranoberfläche derart verändert werden

könnte, was wiederum dann zu einer Erkennung durch den $\gamma\delta$ TZR führen würden (65,68). Weiterhin könnte das Mitwirken und die Interaktion mit anderen molekularen Partnern auch eine Rolle spielen (68). Beobachtungen mittels Antikörper gegen BTN3A, die interessanterweise auch zu einer direkten T-Zell-Aktivierung führen, trugen zur weiteren Entschlüsselung des Aktivierungsmechanismus bei. Sie führten zu einem besseren Verständnis der Frage, welche Auswirkungen die Bindung von pAgs an die B30.2-Domäne haben und wie diese Bindung an die Zelloberfläche übertragen wird, um von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkannt zu werden. Zwei Antikörper, der Agonist 20.1 und der Antagonist 103.2, zeigten dabei gegensätzliche Effekte auf die Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen (59). All diese Beobachtungen bekräftigen die Annahme einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne, die nach pAg Bindung an die intrazelluläre B30.2-Domäne zustande kommt (65). Diese Beobachtungen bestätigten auch die zwingende Rolle der BTN3A Beteiligung bei der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-Aktivierung.

Trotz der vielen neuen Erkenntnisse bleiben weiterhin Fragen offen und stellen Bestandteile neuer Forschungen dar.

1.6 Gastrointestinale Tumore

Bei onkologischen Erkrankungen rückt die Immuntherapie immer weiter in den Fokus neuer Therapieverfahren und Forschungen. Durch neue Erkenntnisse über Zellen des natürlichen Immunsystems, insbesondere der $\gamma\delta$ T-Zellen, erhalten mögliche Immuntherapien basierend auf diesen Zellen einen höheren Stellenwert. Diese neuen Therapieansätze bieten auch bei der Behandlung gastrointestinaler Tumoren Anlass zur Hoffnung auf langfristig gute Ergebnisse. Gastrointestinale Tumore (GI-Tumore) stellen einen Überbegriff einer Gruppe von Tumorarten dar, die das Verdauungssystem betreffen. Es gibt insgesamt 10 Gastrointestinale Tumore. Zu ihnen zählen die Karzinome am Ösophagus, Magen-Darm Trakt, Pankreas, Leber, Gallenblase, Gallenwege sowie Gastrointestinale Stromatumore und neuroendokrine Tumore (69). Die häufigsten Tumore dieser Gruppe sind Darmkarzinome, Leberkarzinome und

Pankreaskarzinome. Die GI-Tumore stellen weltweit eine vorherrschende Erkrankung mit hoher Inzidenzrate dar, die von Region zu Region jedoch variiert und stellt weltweit die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache dar (70).

Für die Ätiologie der Erkrankung spielen bestimmte Risikofaktoren eine große Rolle. Zu ihnen gehören interne sowie externe Faktoren, u.a. Rauchen, Verstädterung, Fettleibigkeit, genetische Mutationen und Infektionen mit beispielsweise *Helicobacter pylori* oder Hepatitis B und C Virusinfektionen. Dies ist auch ein Grund für die weltweit unterschiedliche Verteilung der Inzidenzrate und Verteilung der Tumorarten. Ein gemeinsamer wichtiger Risikofaktor bei allen GI-Tumoren ist das Alter. Zu beachten ist jedoch, dass jeder GI-Tumor auch seine unabhängigen Risikofaktoren hat oder die gemeinsamen Risikofaktoren, wie Bewegungsmangel, Übergewicht, schlechte Ernährung, Rauchen und Alkoholkonsum, im unterschiedlichen Maße mit dem Risiko der Entwicklung des Tumors in Zusammenhang stehen (71). Zusätzlich unterscheiden sich die Risikofaktoren in den Ländern mit höherem, mittlerem und niedrigem Einkommen (72). Viele der externen Risikofaktoren, wie beispielsweise Rauchen, Ernährung, Fettleibigkeit, Alkoholkonsum sind veränderbar und die Änderung dieser Verhaltensweisen gehört zu wichtigen präventiven Maßnahmen.

Die Prognose bei GI-Tumoren ist je nach Verlauf zum Zeitpunkt der Diagnose von Patient zu Patient unterschiedlich. Eine Früherkennung verbessert die Prognose der Patienten. Die Behandlungsmöglichkeiten der GI-Karzinome sind u.a. von Tumorart, Lokalisation, Stadium bei Diagnose und „Wohlbefinden“ des Patienten abhängig. Die Behandlungen umfassen operative Maßnahmen, Bestrahlung, Chemotherapie sowie zunehmend auch Immuntherapie.

1.7 Fragestellungen und Zielsetzung

1-5% der peripheren Blutlymphozyten sind Phosphoantigen (pAg)-reaktive $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Sie besitzen ein Anti-Tumor-Potenzial, dessen Mechanismus der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-Stimulation jedoch noch weitgehend unklar ist. Der Mechanismus und die mögliche Beeinflussung der Aktivierung und Proliferation der zu untersuchenden Zellen sollte im Rahmen dieser Dissertation besser verstanden und analysiert werden. Auch besteht ein langfristiges Ziel darin, neue $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivatoren zu identifizieren und auf dieser Basis Patienten für $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell basierte zelluläre Immuntherapien gegen Tumore oder Infektionskrankheiten präklinisch besser zu selektieren.

Diese experimentelle Arbeit konzentriert sich auf an gastrointestinalen Tumoren erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Normalspendern und beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit folgenden Fragestellungen:

- Ist die Aktivierbarkeit und Proliferation von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gesunder Spender und GI-Tumorpatienten mittels unterschiedlicher Stimulanzen vergleichbar?
- Können $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch agonistische Antikörper gegen das BTN3-Molekül aktiviert werden?
- Können Subgruppen der $\gamma\delta$ T-Zellen charakterisiert werden, die auf mögliche Ursachen für Unterschiede zwischen gesunden Spendern und GI-Tumorpatienten hinweisen könnten?

Mit Hilfe dieser Fragestellungen soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert und die klinisch relevante und häufig durch verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesene verminderte pAg-vermittelte Aktivierbarkeit sowie Proliferation von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen bei Tumorpatienten bestätigt werden. Des Weiteren sollen mögliche Ursachen für diesen Unterschied identifiziert werden und grundsätzliche Unterschiede zwischen gesunden Spendern und an GI-Tumoren erkrankten Patienten definiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkulturmedien und Puffer

Nachstehende Kulturmedien und Puffer wurden für die Zellkultur von Patienten- und Spenderzellen verwendet.

Supplementiertes RPMI-Medium:

500ml RPMI 1640 Medium wurden mit steril filtriertem Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) sowie L-Glutamin (2mM) versetzt (0,2µm sterile Membranfilter).

10% FCS Medium:

Fötale Kälberserum wurde zur Komplementinaktivierung 30 Minuten bei 56°C inkubiert, steril filtriert und 1:10 mit supplementiertem RPMI 1640 Medium versetzt.

10%FCS Medium mit 100U/ml rh IL-2:

Komplementinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) wurde steril filtriert, 1:10 mit supplementiertem RPMI 1640 Medium verdünnt und mit 100U/ml rekombinantem humanem (rh) IL-2 versetzt.

FACS Waschlösung:

500ml Dulbecco`s PBS wurden mit 5ml Hitze-inaktiviertem FCS und 1ml Natriumazid (20%ige Lösung) versetzt.

Ammoniumchlorid-Lyse Puffer (Entfernung der Erythrozyten):

In 400ml destilliertem Wasser wurden 3,22g Ammoniumchlorid, 0,34g Natriumhydrogencarbonat und 0,0148g EDTA gelöst.

Tabelle 1: Kulturmedien, Puffer, Zusätze, Reagenzien

Produkt	Hersteller
PBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)	GIBCO®, Invitrogen, Paisley
Kulturmedium RPMI 1640	GIBCO®, Invitrogen, Paisley
L-Glutamin 2mM	Life Technologies, Paisley
Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10mg/ml	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN™, Biotech, Aidenbach
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Fischar, Saarbrücken
Ficoll Plaque™ Plus	GE Healthcare™, Uppsala

2.1.2 Reagenzien und Stimulanzen

Tabelle 2: Stimulanzen

Produkt	Hersteller
Bromohydrinpyrophosphat (BrHPP)	Innate Pharma, Marseille
4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat (HMBPP)	Sigma
BTN3A mab 20.1	Biolegend, Koblenz
sc 20.1	Labor T. Herrmann, Universität Würzburg
rekombinantes Interleukin 2 (Proleukin)	Novartis, Basel

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Produkt	Hersteller
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich, Saint Louis
Natriumazid	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
Iso Flow Sheath Fluid	Beckman Coulter, Krefeld
Trypanblau	Merck, Darmstadt

2.1.4 Antikörper

Die in der nachstehenden Tabelle aufgelisteten Antikörper wurden zur immunphänotypischen Analyse verwendet. Es wurden jeweils 1µl Antikörper-Konjugat pro 1×10^5 Zellen für die Färbungen verwendet. Die verwendeten Antikörper und unterschiedlichen Antikörper-Panel sind aus Tabelle 4 und Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 4: Antikörper

Antigen	Isotyp	Fluorochrom	Klon	Firma
TCR pan $\gamma\delta$	mouse IgG1	PC5.5	IMMU510	Beckman Coulter
TCR $\gamma\delta$	human IgG1	PE	REA591	Miltenyi Biotec
V δ 1	mouse IgG1	FITC	TS8.2	Thermo Fisher Scientific
TCR V δ 2	mouse IgG1k	APC	123R3	Miltenyi Biotec
CD3	mouse IgG1	ECD	UCHT1	Beckman Coulter
CD3	mouse IgG1	PC5.5	UCHT1	Beckman Coulter
CD16	mouse IgG1	PE	IM1238U	Beckman Coulter
CD28	mouse IgG1	ECD	CD28.2	Beckman Coulter
CD69	mouse IgG2b	PC7	TP1.55.3	Beckman Coulter
CD27	mouse IgG1	Pc7	1A4CD27	Beckman Coulter
PDL1 (CD274)	mouse IgG2b,k	PerCP/cy5.5	29E.2A3	Biolegend
mouse IgG2b,k	Isotypkontrolle	PerCP/cy5.5	MPC-11	Biolegend
CD161	mouse IgG1, k	PB	HP-3G10	Biolegend
CD39	mouse IgG1,k	FITC	MZ18-23C8	Miltenyi Biotec
PD1 (CD279)	mouse IgG1, k	PE	EH12.1	Becton Dickinson
CD45RA	mouse IgG2b,k	FITC	HI100	Becton Dickinson

Tabelle 5: Antikörper Panel: Kombination der verwendeten Antikörper zum Zeitpunkt Tag 0, Tag 1 und Tag 8 (d0, d1,d8)

		FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL9
		FITC	PE	ECD	Pc5.5	Pc7	APC	PB
d0	1.	Vδ1	γδ	CD3	IT	/	Vδ2	/
	2.	Vδ1	γδ	CD3	PDL	CD69	Vδ2	CD161
	3.	CD39	PD1	CD3	γδ	/	Vδ2	/
	4.	CD45-RA	CD16	CD28	CD3	CD27	Vδ2	/
d1		CD39	PD1	/	CD3	CD69	Vδ2	CD161
d8		CD39	PD1	CD3	/	/	Vδ2	CD161

2.1.5 Geräte

2.1.5.1 Durchflusszytometer

FACS Navios®

10-Farb-Analyzer

Laser:

405nm, 40mW; 488nm, 22mW; 638nm, 25mW

Datenanalyse:

Kaluza 1.2

Hersteller:

Beckman Coulter, Krefeld

2.1.5.2 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Vario Dapfsterilisator	Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Hera cell, 5% CO ₂ , 37°C	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA GmbH, Staufen
Mikroskop	Stereo-Mikroskop	Zeiss-Winkel, Göttingen
	Inverses-Mikroskop	Hund, Wetzlar
Sterilbank	Biograd 1360-112	Sanford, Maine
Pipettierhilfe	Accu-Jet®	Braun, Melsungen
Vortex	Vortex Genie™	Bender&Hobein, Zürich
Waage	Präzisionswaage BP 160	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Rotanta/AP Rotor 5094A	Hettich, Tuttlingen
	Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen

2.1.6 Laborbedarf/-materialien

Nachfolgend aufgezählt die verwendeten Labormaterialien: Mikrotiterplatten (Cellstar®), sterile Röhrchen (Cellstar® Tubes), sterile Pipetten (Cellstar®), sterile Pipettenspitzen (Plastibrand®), Combitips®, sterile Filter (Minasart Plus < 0.2 µm Membranfilter mit GF-Vorfilter), FACS Röhrchen, Einfrierröhrchen, Pipettenspitzen, 96 Well Rundbodenplatten, Handschuhe, wurden von den folgenden Firmen bezogen: Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio One (Frickenhausen), Hartenstein (Würzburg), Schleicher Schuell (Dassel).

2.1.7 Patienten/Ethik- und Tierversuchsvotum/Humane Primärzellen/ Spenderzellen

2.1.7.1 Patienten/Ethik- und Tierversuchsvotum

Zur Durchführung der nachstehend erläuterten Untersuchungen wurde Vollblut von 18 Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Tumorentitäten entnommen. Zuvor

gaben die Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung zur Blutentnahme und Durchführung der Untersuchungen ab.

Drei der Patienten waren zusätzlich Studienpatienten der NEOLAP Studie. Diese Patienten waren mit der zusätzlichen Durchführung der Begleitstudie einverstanden.

Genauere Daten zum untersuchten Patientenkollektiv werden im Ergebnisteil (Tab. 8, Kapitel 3.1) erläutert. Für die Durchführung der Untersuchungen im Rahmen der Promotionsarbeit lag eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Würzburg, Medizinische Fakultät, Aktenzeichen 334/15-AM vor. Es fanden keine Tierversuche statt.

2.1.7.2 Zellen

Zur Durchführung der experimentellen Arbeit wurden nachfolgend erläuterte Zellen verwendet:

PBMC

PBMCs sind mononukleäre Zellen, welche aus dem peripheren Blut von gesunden Normalspendern sowie an gastrointestinalen Tumoren erkrankten Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden. PBMC (peripheral blood mononuclear cells) ist die englische Abkürzung für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. Hierzu zählen vor allem Lymphozyten und Monozyten.

2.2 Methoden

2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Gradient)

Um verschiedene Zellpopulationen aus einer Probe nach der Schwebedichte zu trennen, macht man sich ein physikalisches Verfahren zu Nutzen. Dieses Verfahren wird als Dichtegradientenzentrifugation bezeichnet. Das erwähnte Verfahren wurde zur Isolierung von Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) aus humanem Vollblut verwendet. Bei dem verwendeten Vollblut handelt es sich um eine definierte Menge an

EDTA-Vollblut (mindestens 9ml), welches den Patienten nach Abgabe einer Einverständniserklärung entnommen wurde (siehe Kapitel 2.1.7.1 Patienten). In einem 50ml-Falkon-Röhrchen wurde EDTA-Vollblut im 1:1 Verhältnis mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und anschließend auf die in einem zweiten Röhrchen vorgelegte Trennlösung (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden) geschichtet. Bei der Trennlösung handelte es sich um ein synthetisches Saccharosepolymer. Das Mischungsverhältnis des verdünnten Vollblutes und der Ficoll-Lösung betrug auch hier 1:1. Um eine Schichtung der Probe in verschiedene Zellpopulationen nach der Schwere-dichte zu erzielen, wurde das Röhrchen bei 2290 Umdrehungen/min (900rcf) für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, wodurch eine Vermischung der Schichten nach der Zentrifugation verhindert wurde. Nach diesem Vorgang war eine Vierschichtung der Probe zu erkennen. Die PBMCs waren in der Interphase zwischen der Plasmaschicht und der Ficollschicht als dünner Ring zu erkennen. Die Zellen mit den höheren Dichten, zu denen die Granulozyten und die Erythrozyten gehören, bildeten die unteren Schichten, das Zellsediment. Um die PBMCs abnehmen zu können, musste zunächst der Plasmaüberstand abpipettiert werden. Nach vorsichtiger Abnahme der PBMCs in kreisrunden Bewegungen wurden diese in weiteres Falcon Röhrchen pipettiert und in 50ml Waschpuffer (RPMI-Medium) aufgenommen. Nach dem Waschen (5min, 300-350rcf) wurde das sich am Boden abgelagerte Zellpellet in einem geeigneten Volumen RPMI-Medium aufgenommen und stand so zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

2.2.2 FACS Analyse

Um die Expression verschiedener Oberflächenantigene und intrazellulärer Antigene qualitativ und quantitativ analysieren zu können sowie Aussagen über Struktur und Größe von Zellen treffen zu können, wendet man die sogenannte FACS Analyse an. FACS steht für Fluorescence activated cell sorting.

Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Zellen von dem Analysegerät aspiriert und durchlaufen nacheinander einzeln einen Laserstrahl. Je nach Größe und

Struktur der Zellen wird das Licht in unterschiedliche Richtungen gestreut. Fluoreszenzmoleküle auf bzw. in den Zellen werden angeregt und emittieren Licht in einem molekülabhängigen Spektrum. Das gestreute und emittierte Licht wird von Detektoren gesammelt und in elektrisch messbare Signale umgewandelt.

Um die Expression der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle messen zu können, wurden die Proben mit einem oder mehreren spezifischen fluoreszierenden Antikörpern in optimaler Konzentration gefärbt (siehe Kapitel 2.2.5 Färbung). Nach Überführung der Proben in FACS-Röhrchen und Zugabe der entsprechenden Antikörper, wurden die Ansätze kurz gemischt und für 15 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Waschpuffer mittels Zentrifugation (5min, 320g) gewaschen und das Zellpellet mit den gefärbten Oberflächenmolekülen in 100-200µl FACS-Puffer resuspendiert. Genaueres zum Ablauf der Färbung unter dem Kapitel Färbung.

Als Analysegerät wurde das 10-Farben Durchflusszytometer Navios und zur Auswertung der Messdaten das Programm Kaluza 1.2 (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. 5.000 bis 50.000 Zellen wurden pro Messung aufgenommen und der absolute und relative Anteil der verschiedenen zu untersuchenden Zellpopulationen bestimmt. Tote Zellen wurden durch Nutzung der vorderen und seitlichen Streuungsparameter, bedingt durch ihre geringere Größe und Granularität, von der Analyse ausgeschlossen.

2.2.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Um die Anzahl an PBMCs bestimmen zu können, mussten die Zellen zunächst mit einer Trypanblaulösung angefärbt werden. Diese Lösung setzte sich aus 0,4% Trypanblau in einer 0,9%igen NaCl Lösung zusammen. Zur Färbung wurden 10µl Trypanblaulösung mit 10µl der Zellsuspension (1:2 Verdünnung) in einer Färbekammer vermischt und davon wiederum 10µl zur Befüllung einer Neubauer-Zellkammer (Neubauer Improved, Tiefe 0,100 mm, Fläche 0,0025 mm²) verwendet. Der Farbstoff durchdringt die Zellmembran toter Zellen und färbt diese blau, wodurch eine Differenzierung der hellen, vitalen Zellen ermöglicht wird. Mikroskopisch wurden anschließend die vitalen Zellen visuell in zwei der vier Kammern ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurde folgende

Formel angewendet: $\frac{1}{2} \times x \times 10^4 \times 2$, wobei x für die Anzahl der ausgezählten Zellen steht, 10^4 den Kammerfaktor präsentiert und 2 den Verdünnungsfaktor darstellt.

2.2.4 Aktivierung (CD69 Expression) und Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen

Zur Messung und Beurteilung der Aktivierung und Proliferation der zu untersuchenden Zellen wurden die mittels Dichtezentrifugation aus venösem Blut gewonnenen PBMCs mit bestimmten Stimulanzen vermischt, in 96-well Rundbodenplatten (100 μ l/well) ausplattiert und unterschiedlich lange im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert, bevor sie mit verschiedenen Antikörpern gefärbt und gemessen wurden.

Die Messungen zur Bestimmung der Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen und der Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt (Tag 1 Aktivierung, Tag 8 Proliferation). Die zuvor geschilderten Messungen und Methoden (Zellzahlbestimmung, Dichtegradientenzentrifugation) sowie die Vorbereitung der PBMC enthaltenen Zellsuspension (10ml RPMI Lösung) und Ausplattierung für die Messungen an Tag 1 und Tag 8, fanden jeweils an Tag 0 statt.

Für die Aktivierung wurden 2×10^5 PBMCs in 100 μ l 10%igem FCS Medium ohne Zugabe von IL2 ausgesät und jeweils in Dreifachansätzen, ohne Zugabe von Stimulanzen (Negativkontrolle) oder nach Zugabe von 10nM HMBPP, 0,2 μ g/ml BTN3A mab20.1 oder 2 μ g/ml sc20.1 über Nacht (16-24h) bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert.

Für die Proliferation wurden 1×10^5 PBMCs in 100 μ l 10%igem FCS Medium mit IL2 (100U/ml) in Dreifachansätzen ausplattiert und sowohl ohne Zugabe von Stimulanzen (Negativkontrolle), als auch nach Zugabe von HMBPP in drei Konzentrationsstufen (10nM, 1nM und 0,1nM), BTNA3 mab20.1 in drei Konzentrationsstufen (0,2 μ g/ml, 0,02 μ g/ml und 0,002 μ g/ml) und zwei unterschiedliche Kombinationen (Kombi 1 HMBPP, Kombi 2) für 8 Tage bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationszeiten wurden die Proben wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben, mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer Navios analysiert.

2.2.5 Färbung

Für die Versuche wurden unterschiedliche Antikörper (Tabelle 4, Kap. 2.1.4) verwendet. An drei Tagen (Tag 0, Tag 1, Tag 8) wurden unterschiedliche Kombinationen der Antikörper gemessen (Tab. 5, Kap. 2.1.4).

Färbung aus Vollblut:

Zur Bestimmung verschiedener Basiswerte der Probanden wurden vor Beginn der Untersuchungen Färbungen durchgeführt. Jeweils 100µl Vollblut wurden mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tab. 4 und 5, Kap. 2.1.4) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zugabe von jeweils 2 ml Lysepuffer (NH₄CL-Lyse) pro Ansatz und 10-minütiger Inkubation, wurden die Zellen abzentrifugiert (5min,320g) und dann 1x mit FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in ca. 200µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension am Navios gemessen.

Färbung der PBMC an Tag 1 und Tag 8:

Zur Färbung der PBMCs an Tag 1 bzw. an Tag 8 wurden die Ansätze der PBMCs aus den an Tag 0 vorbereitete 96-well Rundbodenplatte jeweils mit einer Kombination verschiedener Antikörper (siehe Tab. 5, Kap. 2.1.4) versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 2ml FACS-Waschpuffer gewaschen, abzentrifugiert (5min, 320g) und die verbleibenden Zellpellets mit ca. 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss an die Färbung wurden die Proben am Navios durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.6 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten der Normalspender sowie der Tumorpatienten wurden mittels des Statistikprogramms SPSS Statistics 26.0 und Microsoft Excel Version 16.54 erstellt und ausgewertet.

Die Signifikanzen wurden unter Anwendung unterschiedlicher nichtparametrischer Tests berechnet. Als Signifikanzniveau wurde in der vorliegenden Arbeit für alle eingesetzten statistischen Tests der p-Wert 0,05 verwendet. Bei Ergebnissen die zwischen $0,01 < p < 0,05$ liegen spricht man von signifikanten Ergebnissen. Bei p-Werten $p < 0,01$ von hochsignifikanten Ergebnissen. Liegt der Wert zwischen 0.05 bis 0,1 handelt es sich um schwach signifikante Ergebnisse (120). Um Signifikanzen zwischen zwei unabhängigen Gruppen zu untersuchen, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Der Wilcoxon-Test wurde als weiterer nichtparametrischer Test verwendet. Die Tests arbeiten mit Rangdaten. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots und Excel Graphen erstellt. Die Messwerte entsprechen Dreifachbestimmungen aus denen der Mittelwert \pm SD kalkuliert wurde.

Um Unterschiede einer Variablen bei zwei unabhängigen Gruppen auf statistische Signifikanz zu testen, bei denen die Voraussetzungen für den t-Test nicht gegeben sind, verwendet man als Alternative den nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test. Im Gegensatz zum t-Test setzt dieser unter anderem neben der Varianzhomogenität auch die Normalverteilung der Daten nicht voraus. Der Test wird daher häufig zur Untersuchung von nichtnormalverteilten stetigen sowie ordinalen Variablen verwendet. Dabei arbeitet der Mann-Whitney-Test nicht mit den ursprünglichen Daten sondern mit Rangdaten. Dabei werden die Werte der beiden Gruppen gepoolt und der Größe nach mit einem Rang versehen. Ob die Nullhypothese verworfen wird oder nicht erfolgt dann durch Abgleich mit einem tabellierten Wert (73). Anhand der dargestellten mittleren Ränge jedes untersuchten Vergleichs kann die Signifikanz gedeutet werden und eine Aussage über die Richtung der ermittelten signifikanten Ergebnisse getroffen werden. Der höhere der beiden ermittelten mittleren Ränge beim Vergleich, in der vorliegenden

Arbeit Normalspender und Patient, bestimmt die Richtung der Signifikanz, das heißt, ob der errechnete P-Wert für den Normalspender oder für den Patienten signifikant höher oder niedriger ist. Je näher die Ränge aneinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis.

Wilcoxon-Test gilt als Test für voneinander abhängigen Stichproben. Er wird verwendet, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test für abhängige Stichproben nicht erfüllt sind. Auch der Wilcoxon-Test basiert auf einer Rangierung der Daten. Es werden negative und positive Ränge ermittelt sowie der mittlere Rang und die Rangsummen. Mittels der tabellarischen Darstellung der ermittelten mittleren Ränge und der ermittelten Signifikanzen kann abgelesen werden, ob die Zahl der positiven oder der negativen Ränge für jeden Vergleich einzeln höher ist. Der dargestellte Hochbuchstabe des höheren Ranges dient zur Überprüfung in der Legende (a-u), mittels dessen bestimmt werden kann, welche Aussage mit der ermittelten Signifikanz verbunden ist. Somit kann dadurch die Richtung und Art der Signifikanz gedeutet werden.

3. Ergebnisse

Anhand der durchgeführten Experimente dieser Arbeit sollten Aussagen über die Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit der untersuchten V γ 9V δ 2 T-Zellen mittels unterschiedlicher Stimuli getroffen werden und mögliche Unterschiede dieser Fähigkeiten zwischen einem gesunden Normalspenderkollektiv und einem Patientenkollektiv charakterisiert werden. Es sollte außerdem noch die Frage geklärt werden, ob mögliche weitere Unterschiede zwischen den Kohorten hinsichtlich zusätzlich exprimierten Oberflächenmolekülen bestehen.

3.1 Patienten- und Normalspenderkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 18 Patientinnen und Patienten, die im Zeitraum von Ende Juli 2017 bis August 2018 die Erstdiagnose eines Gastrointestinalen Tumors erhalten haben und vor Beginn einer Chemotherapie (adjuvant, neoadjuvant, palliativ) standen. Keiner der Patienten hatte sich demnach zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits einer Chemotherapie unterzogen. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose im Durchschnitt 66,1 Jahre alt, wobei die Altersverteilung des Durchschnittsaltes der Männer bei 65,8 Jahren und bei Frauen bei 66,4 Jahren lag. Alle Patienten litten an Gastrointestinalen Tumoren, davon neun Patienten des Kollektivs an einem Pankreaskarzinom, vier Patienten an einem Colonkarzinom und zwei Patienten an einem Rektumkarzinom. An einem Karzinom des Ösophagus, der Gallenwege und des Magens litt jeweils ein Patient des Kollektivs. Die prozentuale Verteilung der Tumorarten lässt sich aus Abbildung 5 entnehmen.

Die Geschlechtsverteilung des untersuchten Patientenkollektivs lag bei 11 Männern (61,1%) und 7 Frauen (38,8%). Bei den Tumoren handelte es sich histologisch um Adenokarzinome. Aus dem untersuchten Patientenkollektiv erhielten 44,4% ihre Erstdiagnose im fortgeschrittenen Tumorstadium entsprechend der TNM Klassifikation im T4 Stadium, 11,1% im T3 Stadium, 5,6% im T2 Stadium und 11,1 % im T1 Stadium. Bei 27,8% der Patienten war bei Diagnosestellung die genaue Tumorklassifizierung nach TNM noch nicht bekannt. Keiner der 18 Patienten litt anamnestisch an relevanten

Vorerkrankungen, die eine immunsuppressive (Vor-)Therapie erfordert hätten. Auch zum Zeitpunkt der Blutentnahmen erhielten die Patienten keine Steroidtherapien oder andere immunsupprimierenden Medikamente.

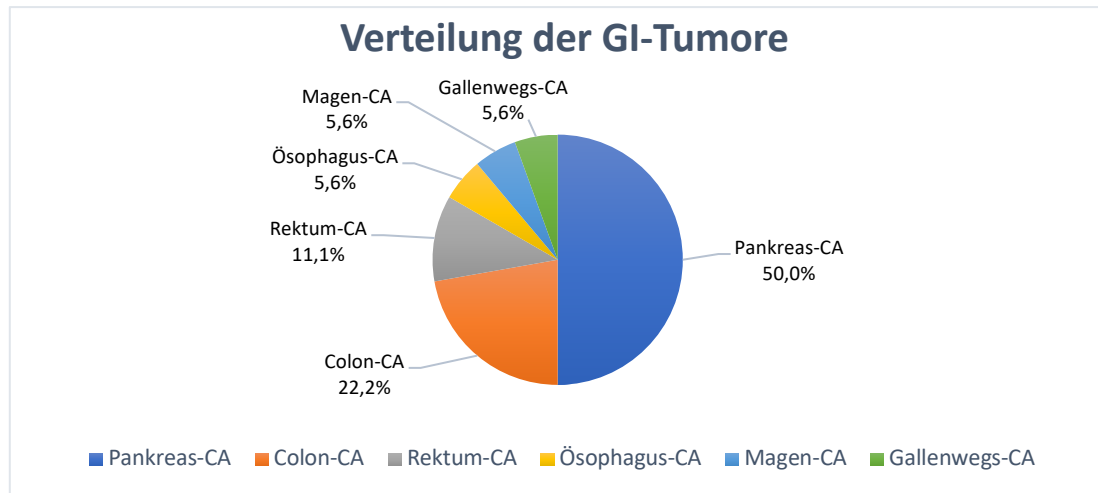


Abbildung 5: Schematische Darstellung des untersuchten Patientenkollektivs.

Patienten	Geschlecht	Alter	Tumorlokalisation	Histologie	Tumorstadium
G11	m	67	Pankreas	mäßig diff. Adenokarzinom	T4, N0, M nicht bekannt
G12	w	47	Pankreas	mäßig diff. Adenokarzinom	T4, N, M nicht bekannt
G13	m	77	Pankreas	Adenokarzinom	TNM nicht bekannt
G14	m	65	Magen	niedrig diff. Siegelringzell-haltiges Adenokarzinom	pT4, pN3a, pM1 (Peritoneum)
G15	m	69	Pankreas	mäßig diff. Adenokarzinom	pT3, pN2, M nicht bekannt
G16	m	64	Colon	mäßig diff. Adenokarzinom	pT3, pN0, pM1 (HEP)
G17	m	54	Colon	mäßig diff. Adenokarzinom	T, N nicht bekannt, pM1 (HEP)
G18	w	78	Colon	gut diff. Siegelringzell-haltiges Adenokarzinom	pT4a, pN1b, pM1 (Peritoneum)
G19	m	58	Colon	mäßig /schlecht diff. Adenokarzinom	pT4, pN2b, M1 (HEP)
G110	m	77	Ösophagus	Adenokarzinom	T1, pN1, M nicht bekannt
G111	w	59	Rektum	gut diff. Adenokarzinom	pT1, pN1, M0
G112	m	53	Pankreas	mäßig diff. Adenokarzinom	TNM nicht bekannt
G113	w	76	Pankreas	Adenokarzinom	cT4, N0, cM1 (HEP)
G114	m	78	Pankreas	Adenokarzinom	T, N nicht bekannt, M1 (Peritoneum)
G115	w	78	Gallenwege	mäßig diff. Adenokarzinom	pT4, N0, M1 (HEP und Peritoneum)
G116	w	61	Rektum	Adenokarzinom	cT4, cN1, cM1 (HEP)
G117	m	62	Pankreas	mäßig diff. Adenokarzinom	TNM nicht bekannt
G118	w	66	Pankreas	schlecht diff. Adenokarzinom	pT2, pN2, M nicht bekannt

Abbildung 6: Patientenkollektiv.

Im Vergleich zum Patientenkollektiv wurden gesunde Normalspender als zweite Kohorte verwendet, welche insgesamt 7 Normalspenderinnen und -Spender umfasste.

Keiner der Normalspender hatte zum Zeitpunkt der Blutentnahme an einer Erkrankung gelitten und niemals eine bekannte maligne Vorerkrankung oder anamnestisch andere relevante Vorerkrankungen nachzuweisen. Die Normalspender waren zum Zeitpunkt der Diagnose im Durchschnitt 57,6 Jahre alt. Die Geschlechterverteilung lag bei 3 Männern (42,9%) und 4 Frauen (57,1%). So wurde das Normalspenderkollektiv in sehr ähnlicher Verteilung zum Patientenkollektiv zum besseren direkten Vergleich gewählt.

3.2 Aktivierbarkeit von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen im Vergleich Normalspender vs. Tumorpatienten

Um die Aktivierbarkeit von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen zu untersuchen und diese zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten zu analysieren, wurde in den Experimenten dieser Arbeit eine Kohorte von Normalspendern (n=7) und eine Kohorte von Tumorpatienten (n=18) hinsichtlich ihrer pAg- bzw. BTN3A-spezifischen Aktivierbarkeit verglichen. Hierzu wurden die PBMCs der jeweiligen Spender aus venösem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit verschiedenen Stimuli zur Aktivierung angeregt und auf den Aktivierungsmarker CD69 hin untersucht. CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker auf T-Zellen, dessen Expression auf der Zelloberfläche sich im Rahmen einer Aktivierung verändert. Zur Aktivierung wurde einerseits ein hoch aktives Phosphoantigen (HMBPP), andererseits der monoklonale BTN3A Antikörper (mAb20.1) und eins von ihm abgeleitetes single chain Konstrukt (sc20.1) verwendet (74,75). Anhand Stimulierung mittels der genannten agonistischen Antikörper, sollte so zusätzlich zur pAg-induzierten Aktivierbarkeit der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen auf eine Aktivierbarkeit dieser Zellen, durch die besagten Antikörper untersucht werden und mögliche Unterschiede zwischen den Kohorten charakterisiert werden.

Für die Versuche wurden 2×10^5 PBMCs in jeweils 100 μ l 10%igem FCS Medium ohne Zugabe eines exogenen Wachstumsfaktors (IL-2) in 96-well Rundbodenplatten ausplattiert und zum einen mit 10nM HMBPP, 0,2 μ g/ml BTN3A mab20.1 und 2 μ g/ml sc20.1 und zum anderen als Negativkontrolle mit Medium ohne Stimulanzen versetzt und anschließend bei 37°C und 5 % Kohlendioxid über Nacht (16-24h) inkubiert.

Anschließend wurden die PBMCs zur Messung der Aktivierung, wie im Methodenteil (Kap. 2.1.4) mit den im d1-Panel (Tab. 5) aufgeführten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Im Rahmen von Voruntersuchungen eigener Vorarbeiten zeigte sich für die gewählten Konzentrationen eine gute Wirkung. Daher wurden diese Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Anzahl der gesamten $V\delta 2^+$ T-Zellen ($V\delta 2^+$ T-Zellen) für jeden Spender wurde mittels Cy5.5-markierten Antikörpern gegen CD3 und APC-markierten Antikörpern gegen $V\delta 2$ durchflusszytometrisch bestimmt. Vorher wurde die prozentuale Anzahl aller $CD3^+$ T-Zellen aus der Gesamtleukozytenzahl des jeweiligen Spenders ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 7 (A)). Bei der Messung zeigten die $V\delta 2^+$ T-Zellen eine APC-Fluoreszenz und sind exemplarisch in Abbildung 7 (B) im oberen rechten Quadranten dargestellt. Diese Messungen fanden für jeden Normalspender bzw. Tumorpatienten immer in derselben Darstellungs- und Messungsweise statt.

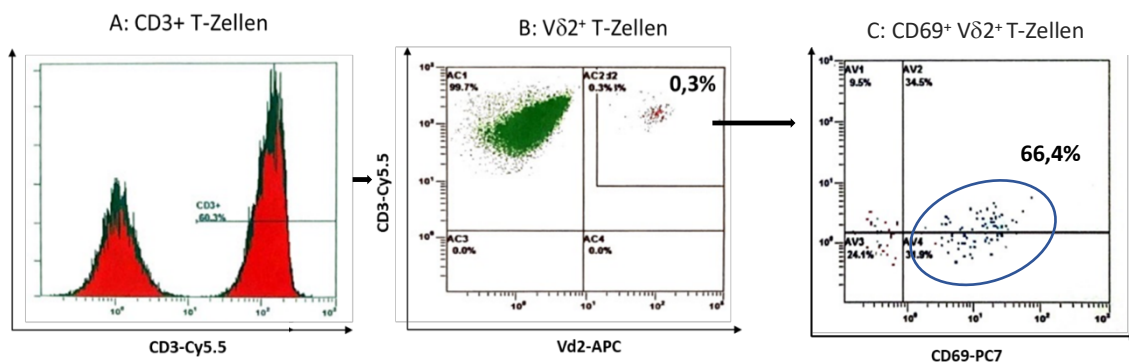
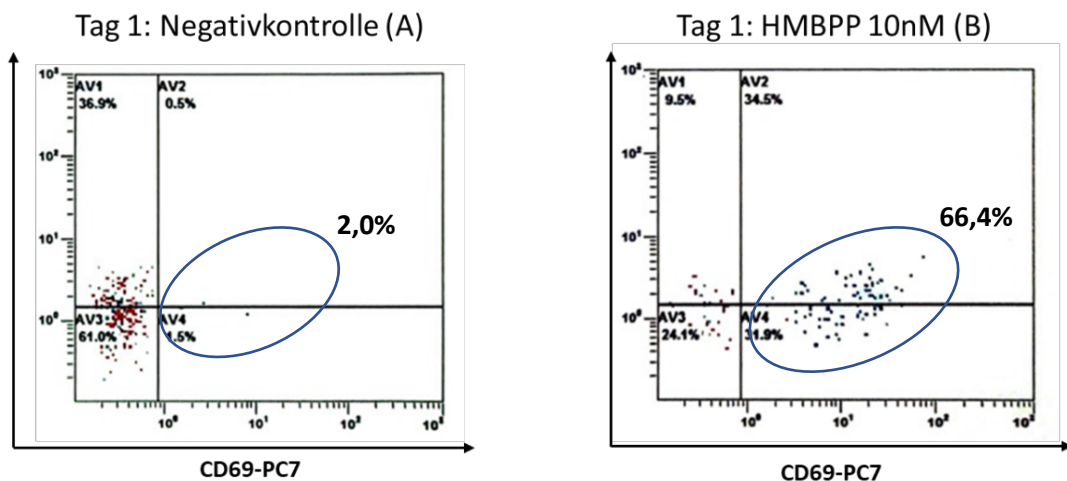


Abbildung 7: Repräsentative FACS-Analyse der $CD3^+$ T-Zellen (A) und deren weitere Messung und Darstellung der aus den $CD3^+$ -Lymphozyten gemessenen $V\delta 2^+$ T-Zellen mittels APC-Fluoreszenz anhand des Beispiels eines Normalspenders (B), sowie die Darstellung der durchgeführten Gatingstrategie auf die $CD69^+$ $V\delta 2^+$ T-Zellen mittels PC7-Fluoreszenz (C).

Da diese Arbeit spezifisch die $V\delta^+$ T-Zellen und deren Expression von Oberflächenantigenen untersuchte, wurde zur weiteren graphischen Darstellung nur auf die zuvor gemessenen $V\delta^+$ T-Zellen (Abb. 7 B) gated und diese weiter, wie sowohl in der zuvor als auch in den nachstehenden Abbildungen veranschaulicht, hinsichtlich des Aktivierungsmarkers CD69 getestet und hierauf gated (Abb. 7 C, Abb. 8, Abb. 10).

Aktivierte $V\delta^+$ T-Zellen binden zusätzlich den Antikörper CD69 und befinden sich als Doppelfluoreszenz in den oberen und unteren rechten Quadranten. Nach Tag 1 exprimieren in dem nachstehenden Beispiel 66,4% aller $V\delta^+$ T-Zellen eines Normalspenders den Aktivierungsmarker CD69 nach Stimulierung durch HMBPP 10nM (Abb. 10 B) und zeigen somit eine Aktivierung. Im Vergleich dazu exprimieren nur 2% der $V\delta^+$ T-Zellen desselben Spenders CD69 bei der Negativkontrolle (Abb. 8 A).

Auch bei dem monoklonalen BTN3A Antikörper (mAb 20.1) (Abb. 8 C) und dessen single chain Konstrukt (sc20.1) (Abb. 8 D) ist eine CD69 Expression (30,2% bzw. 11,3%) und somit eine Aktivierung der $V\delta^+$ T-Zellen ersichtlich. Diese fällt jedoch schwächer aus als bei HMBPP 10nM.



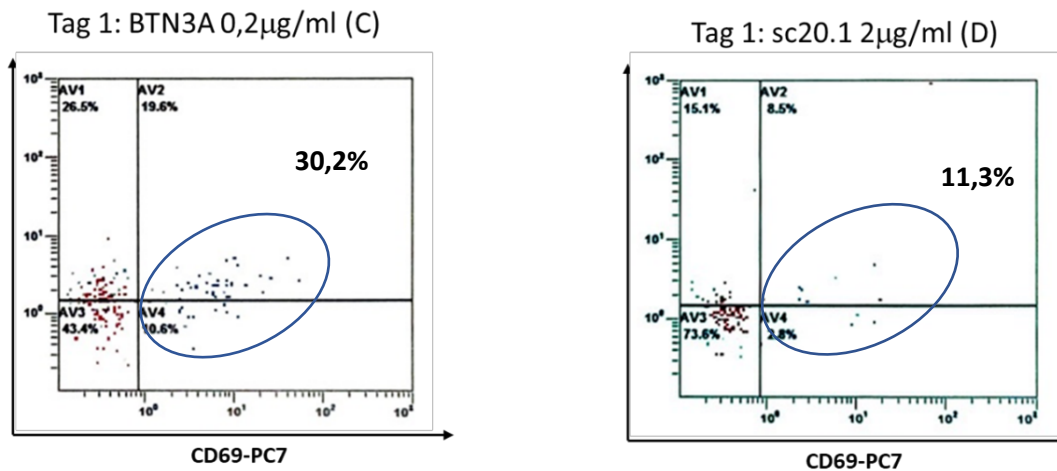


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der CD69 Expression am Beispiel eines Normalspenders (HD9). Nach eintägigem Ansatz mit HMBPP 10nM (B), BTN3A 0,2µg/ml (C) und sc20.1 2µg/ml (D) sieht man als Marker der Aktivierung eine Zunahme der CD69 Expression in den oberen und unteren rechten Quadranten (durch das blaue Oval markiert) im Gegensatz zu deutlich niedrigeren prozentualen CD69 Expression an Tag 1 ohne Stimulanzen (A) (Negativkontrolle). Die Messungen beziehen sich auf die gemessenen gesamt Vδ2+ T-Zellen des Spenders.

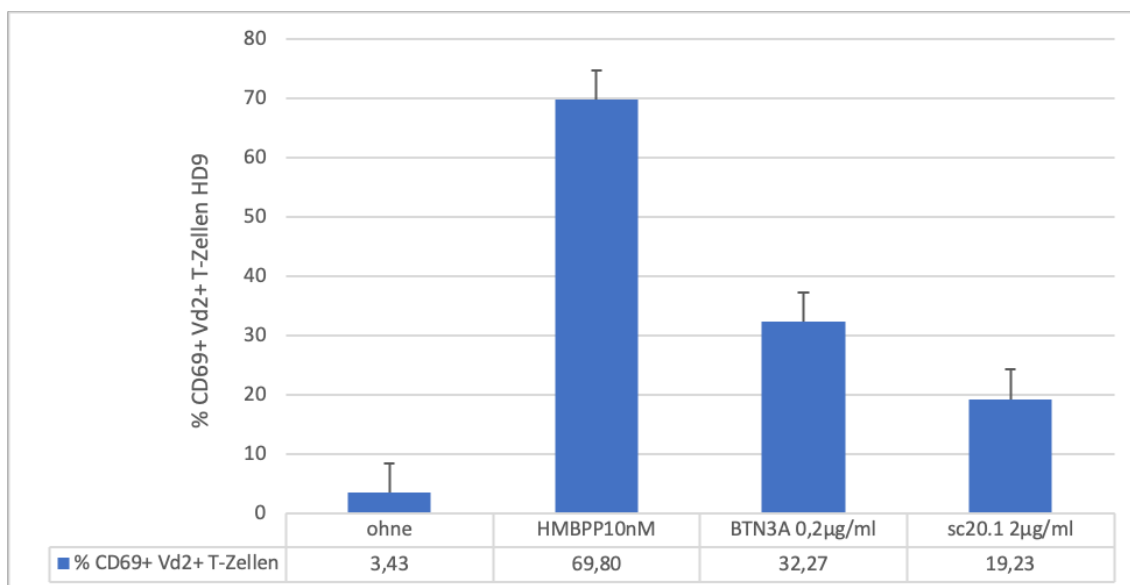


Abbildung 9: Expression von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimuli am Beispiel eines Normalspenders (HD9). Die Bestimmung der Werte fand immer in Dreifachmessungen statt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachmessungen, sowie die Standardabweichung.

Die repräsentativen Abbildungen und Messungen wurden für die Tumorpatientenkohorte in derselben Weise durchgeführt und sind nachstehend am Beispiel eines Tumorpatienten (G11) dargestellt (Abb. 10).

Nach Tag 1 exprimieren in diesem Beispiel 26,7% aller $V\delta 2^+$ T-Zellen des Tumorpatienten CD69 nach Stimulierung durch HMBPP 10nM (Abb. 10 B) und zeigen somit eine Aktivierung. Im Vergleich dazu exprimieren bei der Negativkontrolle des Patienten nur 4,9% der $V\delta 2^+$ T-Zellen CD69 (Abb. 10 A). Auch hier zeigen die $V\delta 2^+$ T-Zellen nach Stimulierung mit dem monoklonalen BTN3A Antikörper (mAb 20.1) (Abb. 10 C) und dessen single chain Konstrukt (sc20.1) (Abb. 10 D) (17,5%. bzw. 6,6%) eine Aktivierung.

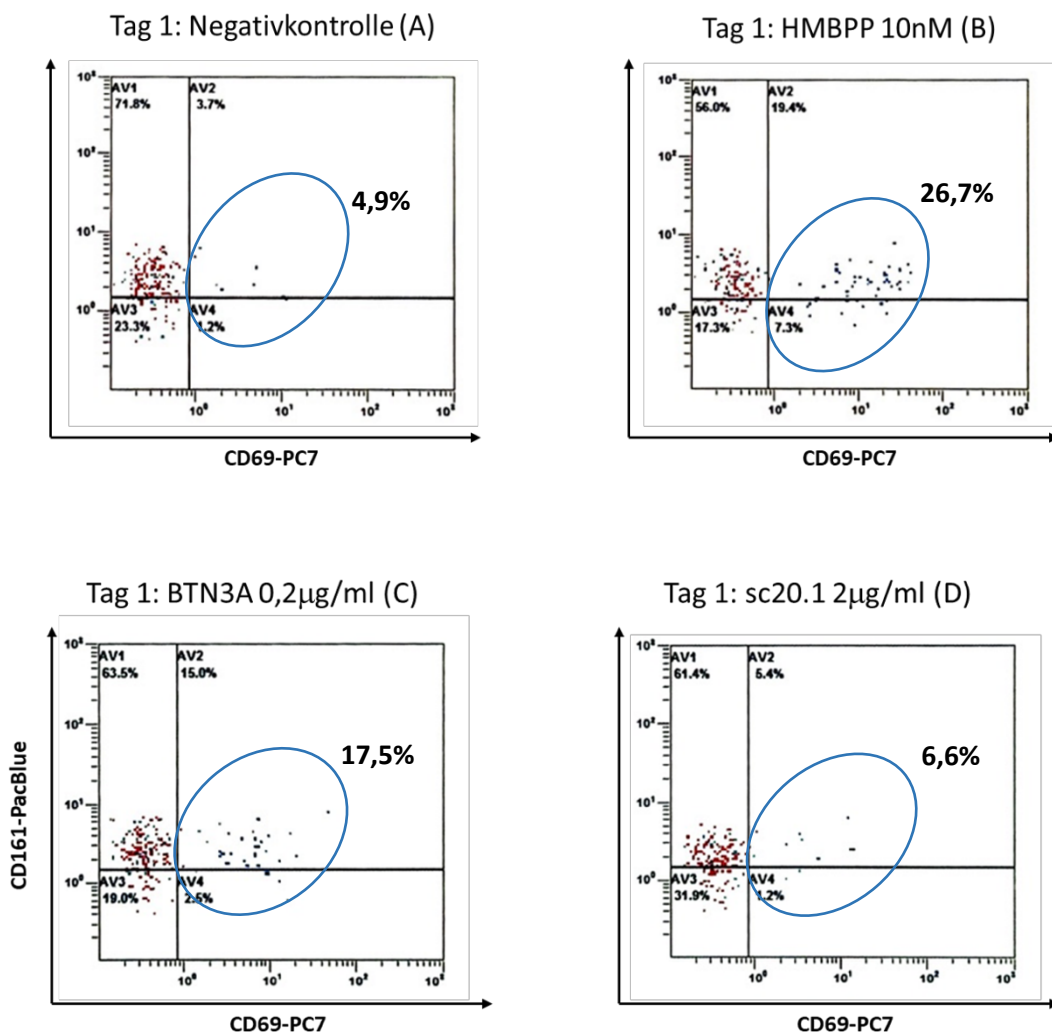


Abbildung 10: Beispiel der CD69 Expression eines Tumorpatienten (G11). Nach eintägigem Ansatz mit HMBPP 10nM (B), BTN3A 0,2 μ g/ml (C) und sc20.1 2 μ g/ml (D) sieht man auch hier als Marker der Aktivierung eine Zunahme der CD69 Expression in den oberen und unteren rechten Quadranten (durch das blaue Oval markiert) im Gegensatz zu deutlich niedrigeren prozentualen CD69 Expression an Tag 1 ohne Stimulanzen (A) (Negativkontrolle). Die Messungen beziehen sich auf die gemessenen gesamt $V\delta 2^+$ T-Zellen des Spenders.

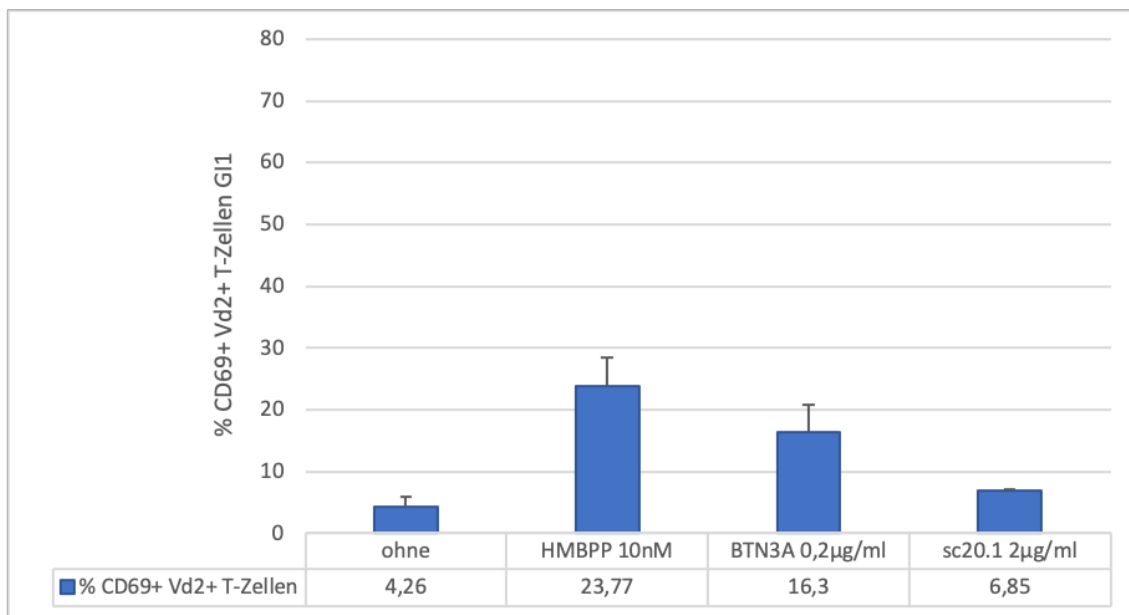


Abbildung 11: Graphische Darstellung der prozentualen CD69 Expression mit den unterschiedlichen Stimuli am Beispiel eines Tumorpatienten (G11). Die Bestimmung der Werte fand immer in Dreifachmessungen statt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachmessungen, sowie die Standardabweichung.

Bei den besagten Messungen zur Bestimmung der Aktivierbarkeit ergaben sich für die unterschiedlichen Stimulanzen unterschiedliche Ergebnisse (siehe Tab. 7).

Grundsätzlich fiel sowohl bei den Normal Spendern als auch bei den Tumorpatienten die Aktivierung der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen bzw. die CD69 Expression mittels HMBPP 10nM stärker aus als die Aktivierung mittels der beiden agonistischen Antikörper. Dies kann anhand der Mittelwerte beurteilt werden und aus Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Variablen der CD69+ $V\delta 2^+$ T-Zellen an Tag 1, die gelb markierte Werte stellen die Mittelwerte der jeweiligen Messungen für CD69+ $V\delta 2^+$ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen an Tag 1 dar, jeweils für die Normalspender und die Tumorpatienten, die grün markierten Werte stellen die Mittelwerte ohne Stimulanzen an Tag 1, jeweils für den Normalspender und den Tumorpatienten dar.

	Gruppe									
	Normalspender (n=7)					Patienten (n=18)				
	Mean	SD	Min	Median	Max	Mean	SD	Min	Median	Max
d1 CD69+ $V\delta 2^+$ ohne	2.80	2.12	0.13	2.52	6.94	7.41	4.71	0.00	7.43	15.86
d1 CD69+ $V\delta 2^+$ HMBPP 10nM	50.66	17.93	18.90	57.82	69.82	34.82	17.07	6.70	35.55	67.93
d1 CD69+ $V\delta 2^+$ BTN3A 0,2µg/ml	31.78	13.73	12.33	32.26	51.45	30.99	17.28	5.70	29.62	67.73
d1 CD69+ $V\delta 2^+$ sc20.1 2µg/ml	17.87	10.62	1.27	17.56	36.90	13.74	10.25	0.17	12.40	37.90

Auch anhand der Berechnung des Stimulationsindex (SI) für die Aktivierung können Unterschiede bezüglich der Aktivierungsfähigkeit der Tumorpatientenkohorte und der Normalspenderkohorte ermittelt und dargestellt werden. Anhand der Darstellung des Stimulationsindexes fällt der SI-Wert für die Aktivierung der V γ 9V δ 2 T-Zellen bzw. die CD69 Expression mittels HMBPP 10nM in beiden Kohorten stärker aus als mittels der agonistischen Antikörper BTN3A 20.1 und sc20.1. Der nachstehenden Tabelle 10 kann entnommen werden, dass die SI-Werte für die Aktivierung der Normalspender unter Verwendung der Stimulanzen grundsätzlich stärker ausfällt als bei den Tumorpatienten. Es wurde ein Cut Off Wert gewählt, der über 5,0 liegen muss, damit von einer ausreichend stattgefunden Aktivierung gesprochen werden kann. Bei den Normalspendern lagen die ermittelten SI-Werte sowohl bei jedem einzelnen Normalspender (Ausnahme bei der Verwendung des Stimulanz sc20.1) als auch bei dem ermittelten Mittelwert aller Normalspender stets oberhalb des Cut Off Wertes von 5,0 (Tab. 8). Bei den Tumorpatienten lagen die ermittelten SI-Werte der einzelnen Patienten häufig unterhalb des Cut Off Wertes. Auch der SI-Mittelwert aller Tumorpatienten für den agonistischen Antikörper sc20.1 lag darunter. Die SI-Mittelwerte aller Tumorpatienten für HMBPP 10nM und BTN3A 20.1 lagen nicht unterhalb des Cut Off Wertes, sie sind jedoch deutlich niedriger als bei den Normalspendern. Dies kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden und wird in der nachfolgenden graphischen Darstellung zusätzlich verdeutlicht (Abb. 12, Tab. 8).

Tabelle 8: Variablen der CD69⁺ V δ 2⁺ T-Zellen an Tag 1 und der jeweilig ermittelte Mittelwert des Stimulationsindex (SI), die gelb markierten Werte stellen die SI-Mittelwerte der jeweiligen Messungen für CD69⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen an Tag 1 dar, jeweils für die Normalspender und die Tumorpatienten, die grün markierten Werte sind die festgelegten SI-Mittelwerte ohne Stimulanzen an Tag 1, jeweils für den Normalspender und den Tumorpatienten.

	Gruppe			
	Normalspender (n=7)		Patienten (n=18)	
	Mean	SI	Mean	SI
d1 CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ ohne	2.80	1	7.41	1
d1 CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ HMBPP 10nM	50.66	38.90	34.82	8.56
d1 CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ BTN3A 0,2 μ g/ml	31.78	25.17	30.99	7.39
d1 CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ sc20.1 2 μ g/ml	17.87	9.16	13.74	2.12

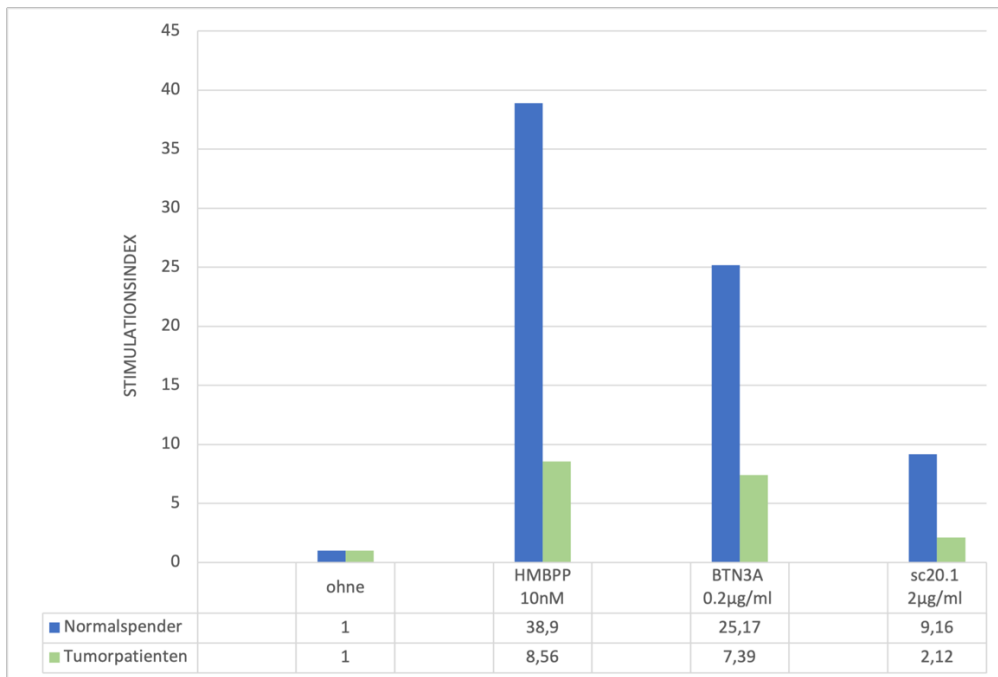
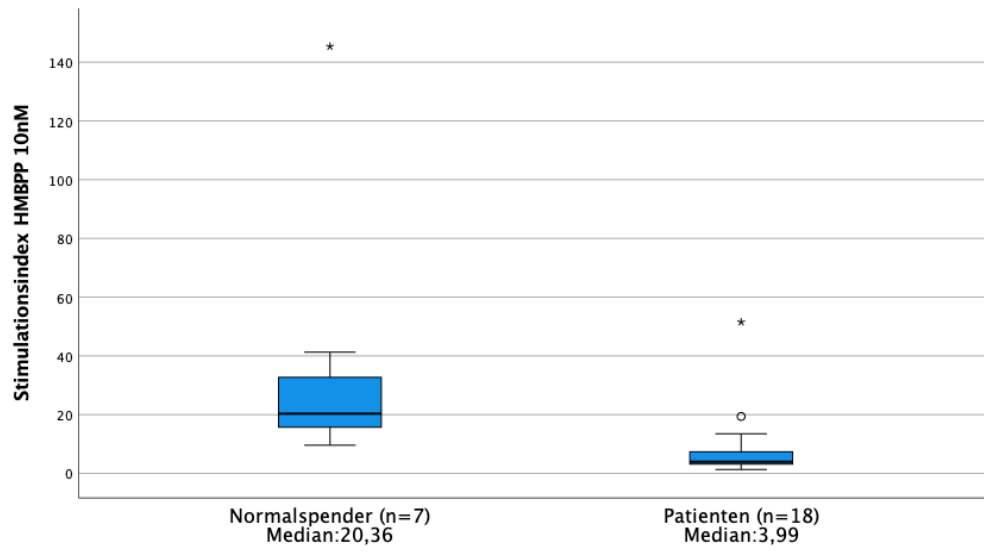


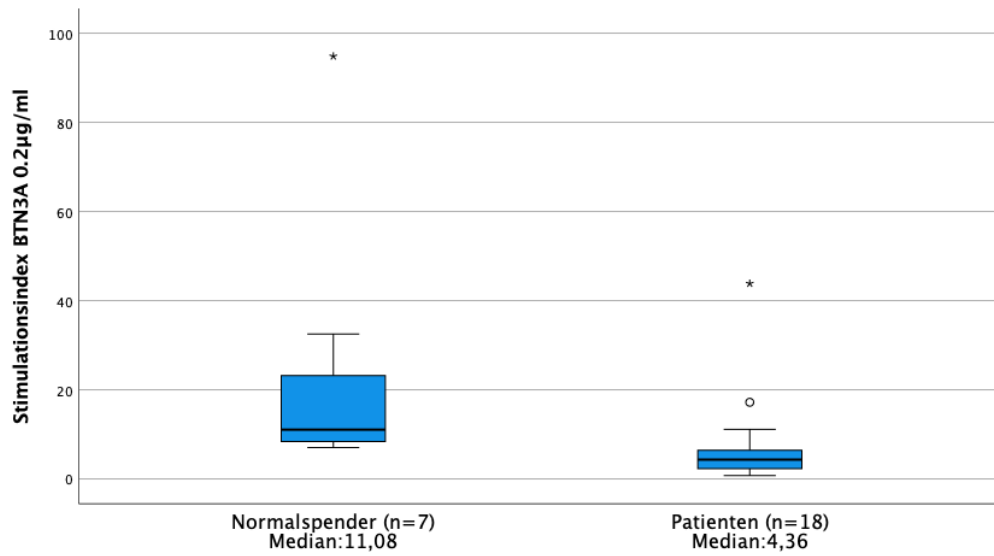
Abbildung 12: Graphische Darstellung der ermittelten SI-Mittelwerte für die Aktivierung bzw. CD69 Expression an Tag 1, Gegenüberstellung der SI-Mittelwerte der Normalspender (blau) und Tumorpatienten (grün) unter Verwendung der einzelnen Stimulanzen und ohne Stimulanzen.

Auch in den nachfolgend dargestellten Boxplots wird der Unterschied zwischen den beiden Kohorten bezüglich des Stimulationsindex für die einzelnen Stimulanzen ersichtlich.

HMBPP 10nM (A)



BTN3A 0,2µg/ml (B)



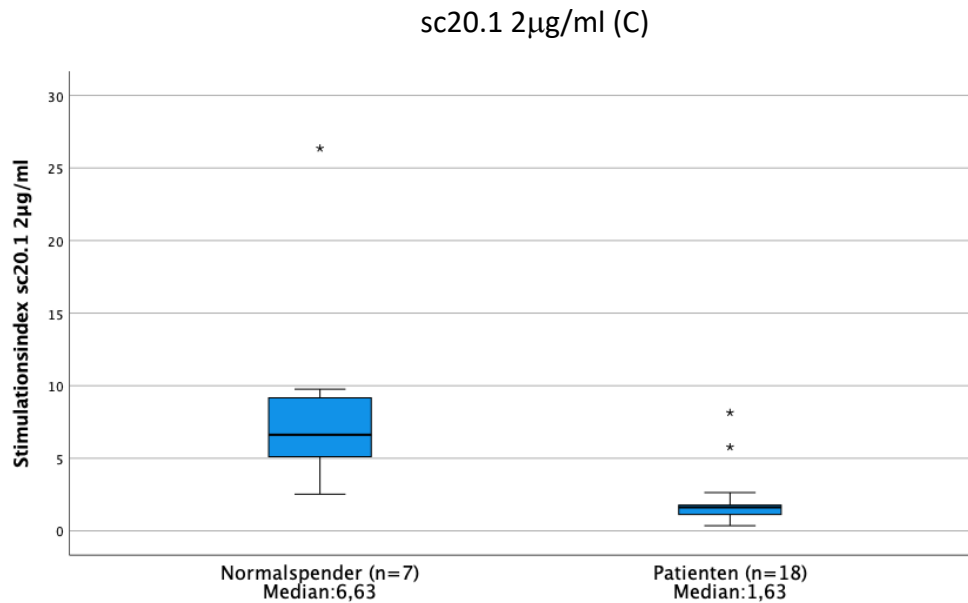


Abbildung 13: Vergleich der ermittelten Stimulationsindizes der CD69 Expression bzw. Aktivierung der V δ 2⁺ T-Zellen an Tag 1 zwischen Normalspendern und Tumorpatienten unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen (HMBPP 10nM (A), BTN3A 0,2µg/ml (B), sc20.1 2µg/ml (C)). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25 igste und 75 igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

Zusammenfassend wird in Tabelle 9 der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kohorten anhand der berechneten Stimulationsindizes und des gewählten Cut Off Wert von 5,0 für die Aktivierung erneut verdeutlicht. Es wird ersichtlich, dass die V γ 9V δ 2 T-Zellen der Normalspender deutlich besser aktiviert werden können. Hiernach ließen sich 100% aller Normalspender bei dem Stimulanz HMBPP 10nM und BTN3A 0,2µg/ml aktivieren. Unter Verwendung des Stimulanz sc20.1 2µg/ml ließen sich 71,43% der Normalspender aktivieren. Im Vergleich dazu ließen sich nur jeweils 47,06% aller Tumorpatienten bei HMBPP 10nM, 35,29% bei BTN3A 0,2µg/ml und 12,50 % bei sc20.1 2µg/ml aktivieren.

Tabelle 9: Prozentuale Darstellung und Vergleich der Aktivierungsfähigkeit mittels der unterschiedlichen Stimulanzen anhand der ermittelten Stimulationsindizes für die beiden untersuchten Kohorten.

	Normalspender	Tumorpatient	Normalspender	Tumorpatient
	% aktiviert		% nicht aktiviert	
<i>HMBPP 10nM</i>	100%	47,06%	0%	52,94%
<i>BTN3A 0.2µg/ml</i>	100%	35,29%	0%	64,71%
<i>sc20.1 2µg/ml</i>	71,43%	12,50%	28,57%	87,50%

Um zu klären, ob es sich um signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit handelte, wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Es wurden auf Signifikanzen hinsichtlich der Unterschiede ohne Stimulanzen und mit unterschiedlichen Stimulanzen hin getestet. Hierbei ergaben sich insgesamt zwei signifikante Unterschiede. Die Normalspender wiesen bei HMBPP 10nM signifikant höhere CD69⁺ Vδ2 T-Zellen auf als die Tumorpatienten. Es ergab sich ein p-Wert von p=0,04 (Abb. 14).

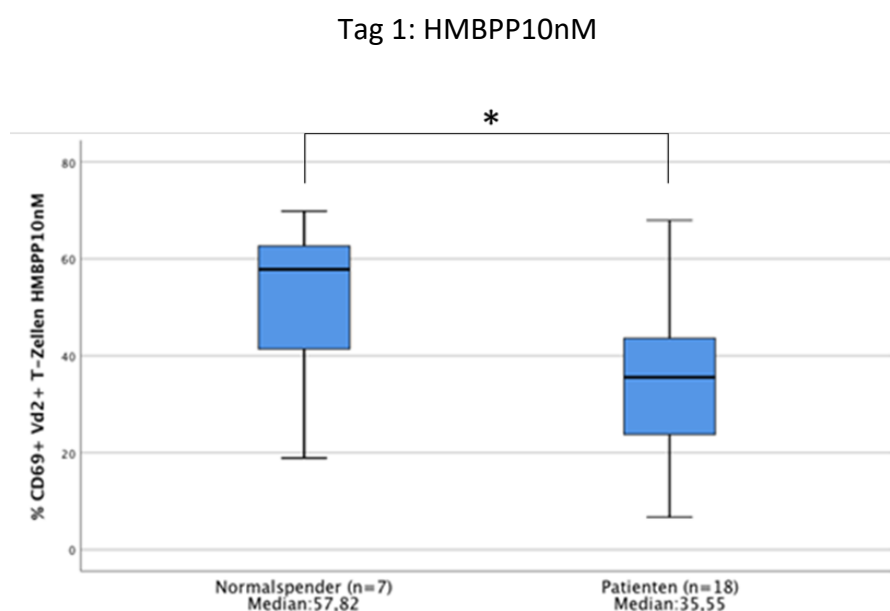
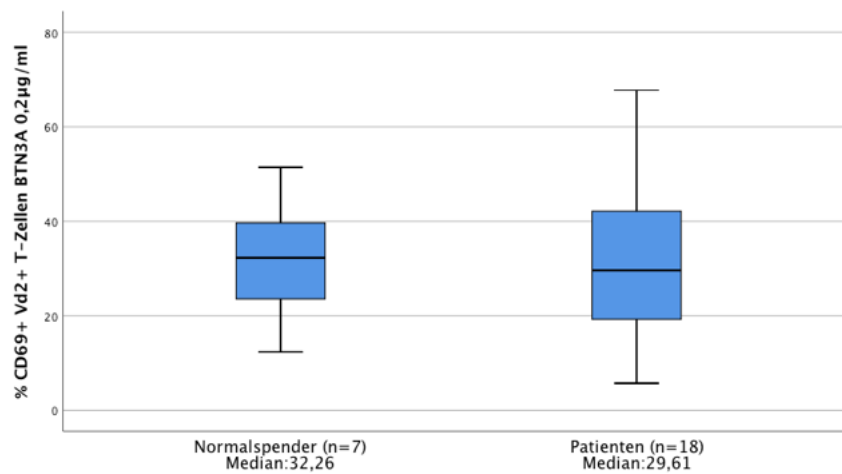


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der CD69⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten mit HMBPP 10nM als Stimulanz. *: p=0,04 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): Normalspender hatten signifikant höhere CD69⁺ Vδ2 T-Zellen. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{igste} und 75^{igste} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

Bezüglich der Aktivierung mittels der agonistischen Antikörper BTN3A 20.1 und sc20.1 konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten ermittelt werden (Abb. 15). Die p-Werte lagen für BTN3A 20.1 bei $p=0,80$ und für sc20.1. bei $p=0,29$.

Tag 1: BTN3A 20.1 0,2 μ g/ml (A)



Tag 1: sc20.1 2 μ g/ml (B)

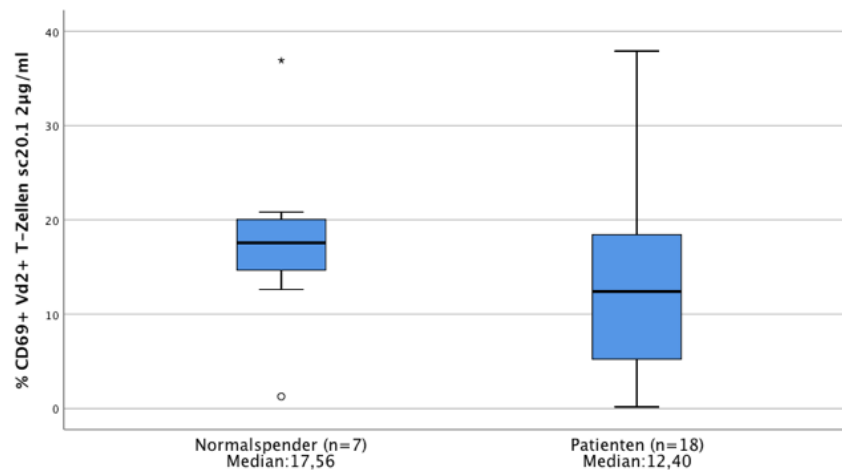


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der CD69⁺ V δ 2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten mit BTN3A 20.1 0,2 μ g/ml (A) und sc20.1 2 μ g/ml (B) als Stimulanzen. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25.igste und 75.igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

Die zweite ermittelte Signifikanz ergab sich bei dem Vergleich der Negativkontrollen zwischen den Normal Spendern und den Tumorpatienten. Hier wiesen die Patienten ohne Stimulanzen signifikant höhere CD69⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender (p=0,01) (Abb. 16).

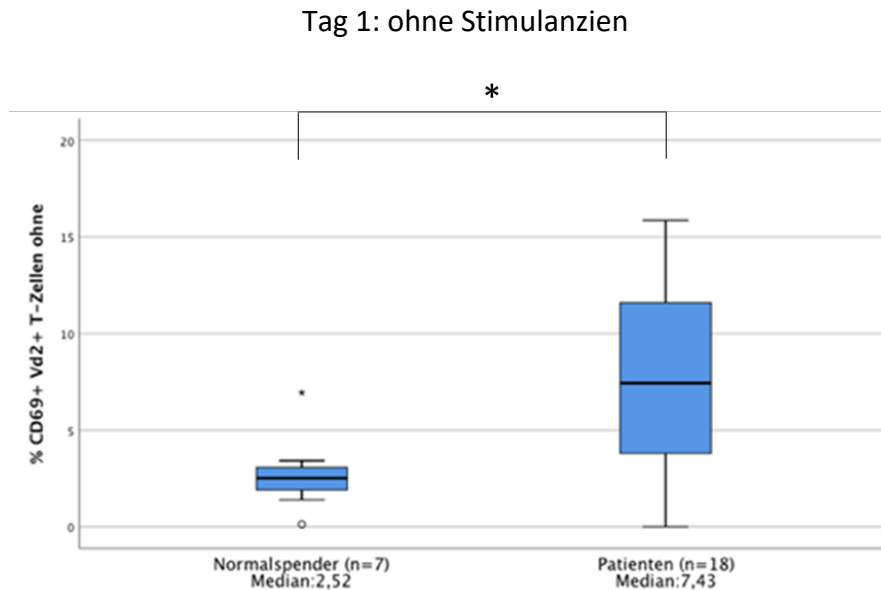


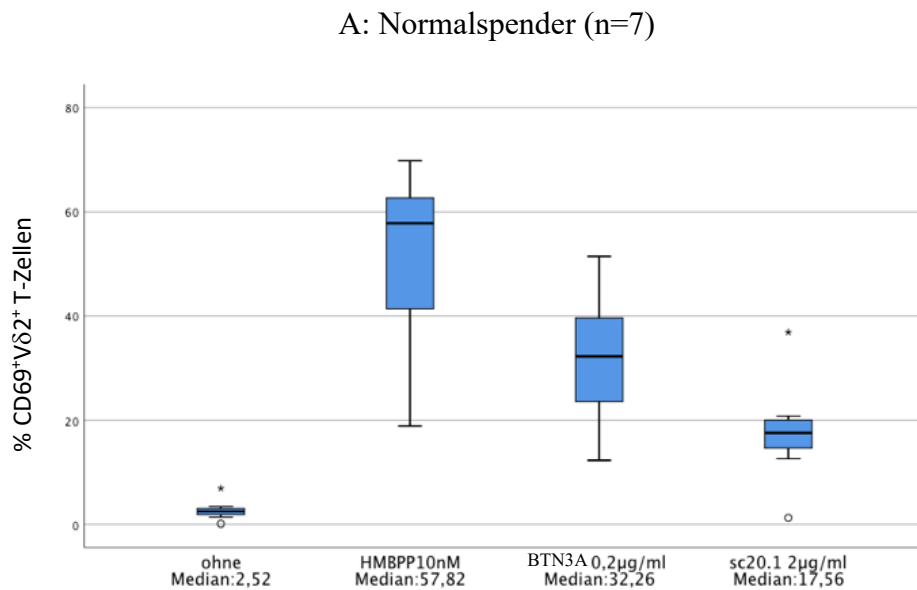
Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD69⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen (Negativkontrolle). *: p=0,01 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD69⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{igste} und 75^{igste} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer

Aus der nachstehenden Tabelle 10 können die ermittelten P-Werte entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 32 mittels der mittleren Ränge (siehe Anhang) die Richtung der ermittelten Signifikanz gedeutet werden. Der höhere der beiden mittleren Ränge für jeden Vergleich gibt die Signifikanzrichtung an. Damit kann eine Aussage getroffen werden, ob die Signifikanzen höher für die Normalspender oder höher für die Tumorpatienten ausfielen.

Tabelle 10: Signifikanzberechnung. Errechnete P-Werte (asymptotische Signifikanz) mittels Mann-Whitney-U-Test. Vergleich der Kohorten hinsichtlich ihrer Aktivierungsfähigkeit (CD69⁺ Vδ2⁺ T-Zellwerte) mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz. Blau markierte Werte sind signifikante P-Werte (p<0,05). Deutung mittels Tabelle 32 im Anhang.

<i>Statistik für Test</i>				
	d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml
Mann-Whitney-U	21.500	29.000	59.000	43.000
Wilcoxon-W	49.500	200.000	230.000	196.000
Z	-2.512	-2.058	-0.242	-1.048
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.012	0.040	0.809	0.295

Nachstehend wird die unterschiedliche Aktivierungsfähigkeit (CD69 Expression) der beiden Kohorten graphisch verdeutlicht (Abb. 17).



B: Tumorpatienten (n=18)

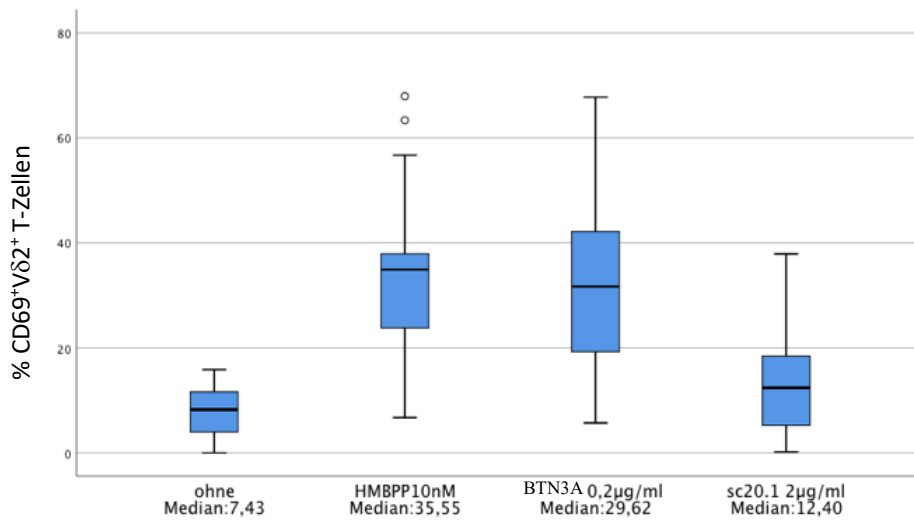


Abbildung 17: Boxplots der prozentualen CD69⁺ Vδ2⁺ T-Zellen für alle Stimulanzen für Normalspender (A) und Tumorpatienten (B). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25.igste und 75.igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

3.3 Proliferation von Vγ9Vδ2 T-Zellen im Vergleich Normalspender vs. Tumorpatienten

Des Weiteren wurde die Kohorte der Normalspender (n=7) und die Kohorte der Tumorpatienten (n=18) hinsichtlich der pAg- bzw. BTN3A-spezifischen Proliferation der Vγ9Vδ2 T-Zellen untersucht und verglichen. Anhand dieser Stimulierung sollte eine Aussage bezüglich ihrer Proliferationsfähigkeit unter Verwendung der unterschiedlichen Stimuli getroffen werden und auch hier mögliche Unterschiede zwischen den beiden Kohorten charakterisiert werden.

Hierzu wurden jeweils 1×10^5 PBMCs der Probanden in je 100µl 10%igem FCS Medium mit Zugabe eines exogenen Wachstumsfaktors (IL-2) in 96-well Rundbodenplatten ausplattiert und nach Zugabe der jeweiligen Stimulanzen bei 37°C und 5 % Kohlendioxid für acht Tage inkubiert.

Einerseits wurde das hoch aktive Phosphoantigen HMBPP in den Konzentrationen 10nM, 1nM, 0,1nM und andererseits der monoklonale agonistische BTN3A Antikörper (mAb20.1) in den Konzentrationen 0,2µg/ml, 0,02µg/ml und 0,002µg/ml verwendet. Als Negativkontrolle dienten nur mit Medium inkubierte unbehandelte PBMCs.

Die Anzahl der gesamten Vδ2 T-Zellen (Vδ2⁺ T-Zellen) wurde auch bei den Messungen zur Proliferation für jeden Spender durch Oberflächenfärbung mittels Cy5.5-markierten Antikörpern gegen CD3 und APC-markierten Antikörpern gegen Vδ2 durchflusszytometrisch bestimmt und gemessen. Dies fand nach Färbung mit unterschiedlichen Oberflächenantikörpern (siehe d8-Panel, Tab. 5, Kap. 2.1.4) nach achttägiger Inkubation statt.

Bei der Messung zeigten die Vδ2⁺ T-Zellen eine APC-Fluoreszenz und sind exemplarisch in Abbildung 18 und 19 im oberen rechten Quadranten dargestellt. Auch diese Messungen fanden für jeden Normalspender bzw. Tumorpatienten immer in derselben Weise statt. Bei der nachstehenden repräsentativen Darstellung der gesamten Vδ2⁺ T-Zell Messungen an Tag 8 eines Normalspenders (Abb. 18) sieht man deutlich eine Proliferation der Vδ2⁺ T-Zellen nach Inkubation.

Mit dem Stimulanz HMBPP 10nM im Vergleich zur Vδ2⁺ T-Zellmenge an Tag 8 ohne Stimulanz vermehrten sich die Vδ2 T-Zellen in diesem Beispiel von 1,7% ohne Stimulierung (Abb.18 A) auf 87,0% nach Stimulation (Abb. 18 B). Die Proliferation durch die anderen Konzentrationen und Stimuli kann den weiteren Beispielen dieses Spenders entnommen werden (Abb. 18 C-G).

Die exemplarisch dargestellten Messungen wurden für alle verwendeten Konzentrationen und Stimulanzen auch für die Tumorpatienten durchgeführt. Die Proliferationsfähigkeit am Beispiel eines Tumorpatienten kann der Abbildung 19 entnommen werden.

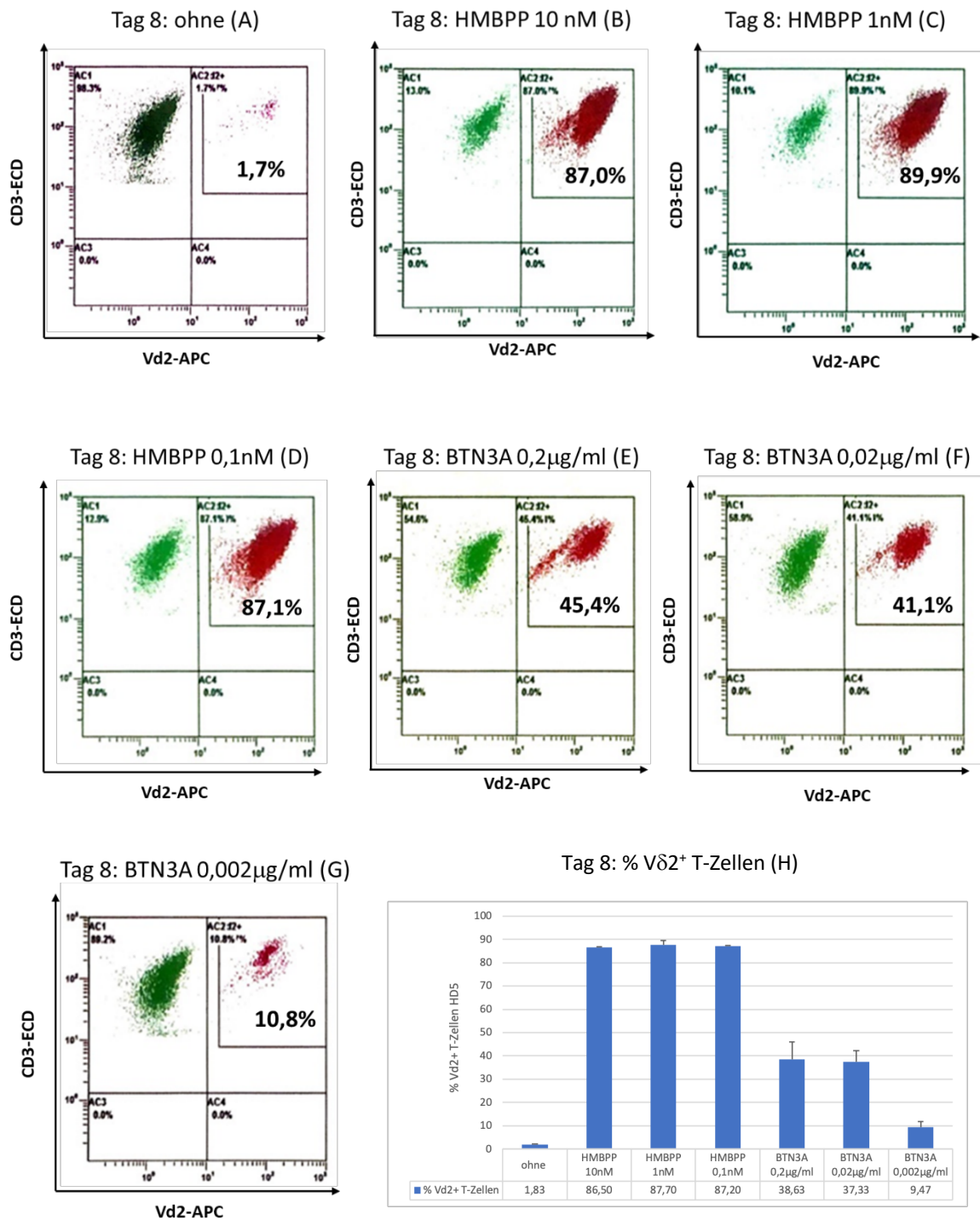


Abbildung 18: Repräsentative FACS-Analyse der Vδ2⁺ T-Zellen Proliferation am Beispiel eines Normalspenders (HD5). Nach achttägigem Ansatz mit HMBPP 10nM (B), 1nM (C), 0,1nM (D) sowie BTN3A 0,2µg/ml (E), 0,02µg/ml (F), 0,002µg/ml (G) sieht man als Zeichen der Proliferation eine Zunahme der prozentualen Zellmenge in dem oberen rechten Quadranten an Tag 8 im Gegensatz zu deutlich niedrigeren prozentualen Zellmenge an Tag 8 ohne Stimulanzen (A) (Negativkontrolle) (H): Exemplarische Darstellung der prozentualen Vδ2⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimuli am Beispiel eines Normalspenders (HD5). Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen und die Standardabweichung.

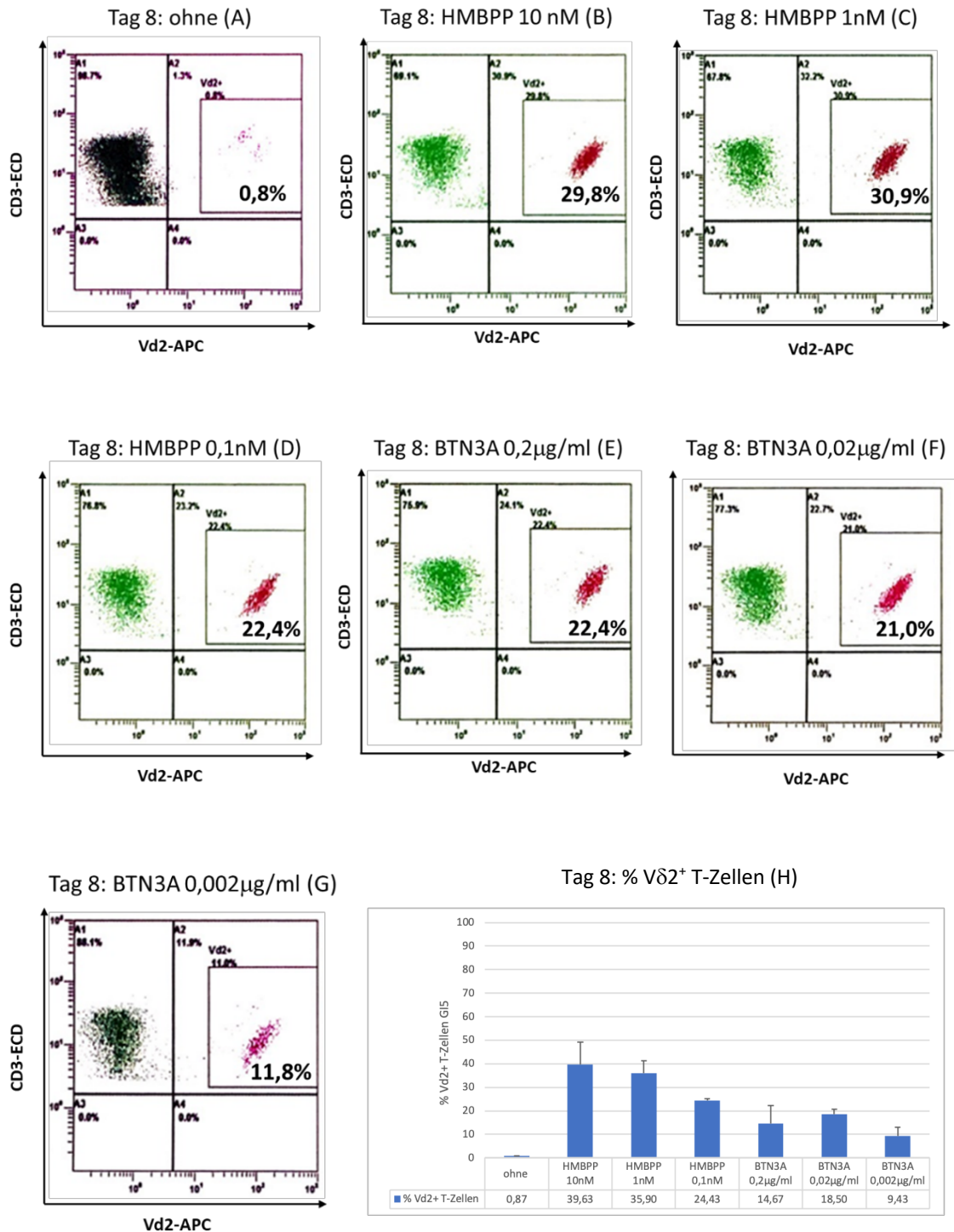


Abbildung 19: Repräsentative Plots der Vδ2⁺ T-Zellen Proliferation am Beispiel eines Tumorpatienten (GI5). Nach achttägigem Ansatz mit HMBPP 10nM (B), 1nM (C), 0,1nM (D) sowie BTN3A 0,2µg/ml (E), 0,02µg/ml (F), 0,002µg/ml (G) sieht man als Zeichen der Proliferation eine Zunahme der prozentualen Zellmenge in dem oberen rechten Quadranten im Gegensatz zu deutlich niedrigeren prozentualen Zellmenge ohne Stimulanzien (A) (Negativkontrolle). (H): Exemplarische Darstellung der prozentualen Vδ2⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimuli am Beispiel eines Tumorpatienten (GI5). Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen und die Standardabweichung.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich deutlich eine Zunahme der V δ 2 T-Zellen bei Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen in beiden Kohorten im Gegensatz zu den Negativkontrollen. Hierbei zeigte sich jedoch ein höheres Auswachsen der Zellen bei den Normalspendern für die verschiedenen Konzentrationen, sowohl bei HMBPP als auch bei BTN3A mab20.1 im Vergleich zu den Tumorkontrollen (Ausnahme bei der 0,002 μ g/ml Konzentration von BTN3A mab20.1) bezogen auf die Betrachtung der Mittelwerte der Ergebnisse (siehe Tab. 11).

Tabelle 11: Variablen der Messungen der Proliferation (V δ 2⁺ T-Zellen), gelb markierte Werte stellen die Mittelwerte der jeweiligen Messungen für V δ 2⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen dar, jeweils für die Normalspender und die Tumorkontrollen, grün markierte Werte stellen die Mittelwerte für die Negativkontrollen an Tag 8, jeweils für die Normalspender und die Tumorkontrollen, dar.

	Gruppe									
	Normalspender (n=7)					Patienten (n=18)				
	Mean	SD	Min	Median	Max	Mean	SD	Min	Median	Max
d8 V δ 2 ⁺ ohne	1.01	0.56	0.33	1.03	1.83	2.33	3.52	0.24	1.65	15.89
d8 V δ 2 ⁺ HMBPP10nM	56.11	24.99	13.30	60.71	86.50	39.78	28.88	1.90	38.17	80.49
d8 V δ 2 ⁺ HMBPP1nM	51.88	28.50	8.37	59.33	87.70	36.77	29.24	1.86	38.91	82.45
d8 V δ 2 ⁺ HMBPP0.1nM	45.51	32.02	3.87	54.97	87.20	22.46	20.58	2.14	17.95	65.86
d8 V δ 2 ⁺ BTN3A0.2 μ g/ml	22.91	18.30	4.90	14.40	51.70	15.34	12.32	0.83	12.83	37.68
d8 V δ 2 ⁺ BTN3A0.02 μ g/ml	22.75	15.96	2.43	18.97	45.18	17.22	17.27	0.26	13.45	57.04
d8 V δ 2 ⁺ BTN3A0.002 μ g/ml	7.33	7.41	0.50	5.17	22.46	12.74	11.54	0.85	8.88	36.00

Auch mittels Ermittlung der Stimulationsindizes (SI) für die Proliferation der V γ 9V δ 2 T-Zellen können Unterschiede bezüglich der Proliferationsfähigkeit der beiden Kohorte ermittelt und dargestellt werden. Anhand der Darstellung des Stimulationsindex fällt der SI-Wert für die Proliferation der V γ 9V δ 2 T-Zellen mittels HMBPP 10nM in beiden Kohorten stärker aus als mittels des agonistischen Antikörpers BTN3A 20.1. Der nachstehenden Tabelle 12 kann entnommen werden, dass die SI-Werte für die Proliferation der Normalspender unter Verwendung der Stimulanzen grundsätzlich stärker ausfällt als bei den Tumorkontrollen, mit Ausnahme bei dem Stimulanz BTN3A0.002 μ g/ml. Es wurde auch hier ein Cut Off Wert gewählt, der über 5,0 liegen muss, damit von einer ausreichend stattgefunden Proliferation gesprochen werden

kann. Bei den Normal Spendern lagen die ermittelten SI-Werte sowohl bei jedem einzelnen Normal Spender (Ausnahme bei BTN3A 0,002µg/ml) als auch bei dem ermittelten Mittelwert aller Normal Spender für jedes Stimulanz oberhalb des Cut Off Wertes von 5,0 (Tab. 11). Bei den Tumorpatienten lagen die ermittelten SI-Werte der einzelnen Patienten häufig unterhalb des Cut Off Wertes. Die ermittelten SI-Mittelwerte aller Tumorpatienten für die verwendeten Stimulanzen lagen nicht unterhalb des Cut Off Wertes, sie fallen jedoch niedriger aus als bei den Normal Spendern. Unter Verwendung des Stimulanz BTN3A 0, 002µg/ml jedoch, liegt der SI-Mittelwert der Tumorpatienten höher. Dies kann Tabelle 12 entnommen werden und wird in der nachfolgenden graphischen Darstellung zusätzlich verdeutlicht (Tab. 12, Abb. 20).

Tabelle 12: Variablen der Vδ2⁺ T-Zellen an Tag 8 und der jeweilig ermittelte Mittelwert des Stimulationsindex (SI), die gelb markierten Werte stellen die SI-Mittelwerte der jeweiligen Messungen für Vδ2⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen an Tag 8 dar, jeweils für die Normal Spender und die Tumorpatienten, die grün markierten Werte sind die festgelegten SI-Mittelwerte ohne Stimulanzen an Tag 8, jeweils für den Normal Spender und den Tumorpatienten.

	Gruppe			
	Normal Spender (n=7)		Patienten (n=18)	
	Mean	SI	Mean	SI
d8 Vδ2 ⁺ ohne	1.01	1	2.33	1
d8 Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	56.11	61.50	39.78	33.51
d8 Vδ2 ⁺ HMBPP1nM	51.88	49.96	36.77	29.01
d8 Vδ2 ⁺ HMBPP0.1nM	45.51	42.51	22.46	19.25
d8 Vδ2 ⁺ BTN3A0.2µg/ml	22.91	22.01	15.34	10.90
d8 Vδ2 ⁺ BTN3A0.02µg/ml	22.75	21.49	17.22	12.04
d8 Vδ2 ⁺ BTN3A0.002µg/ml	7.33	6.29	12.74	9.01

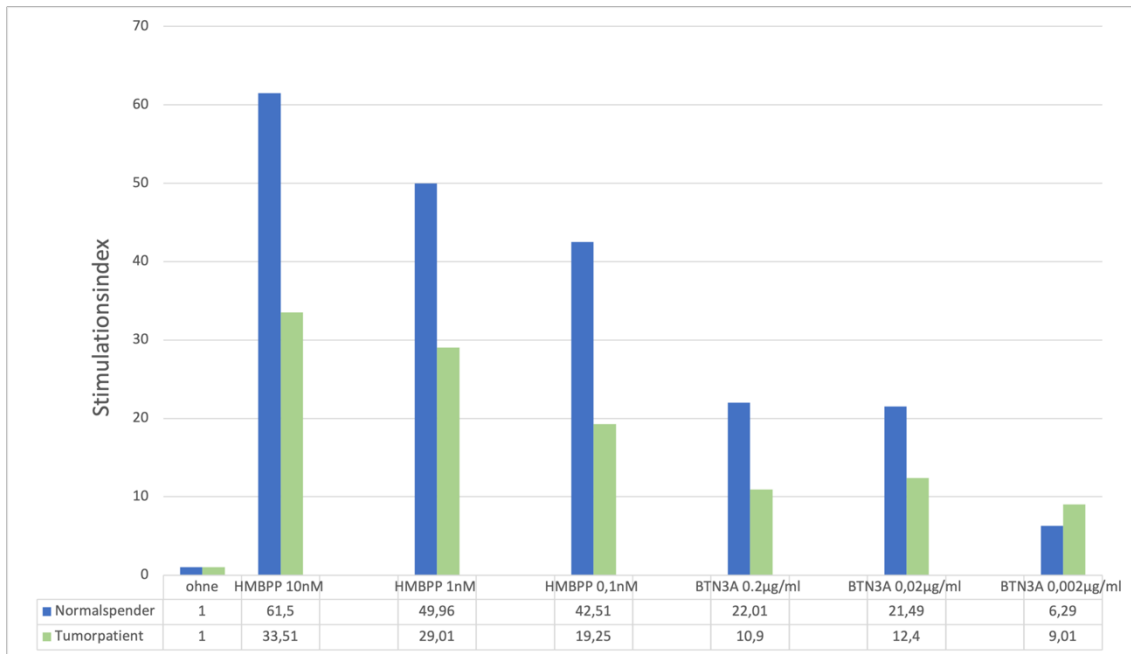
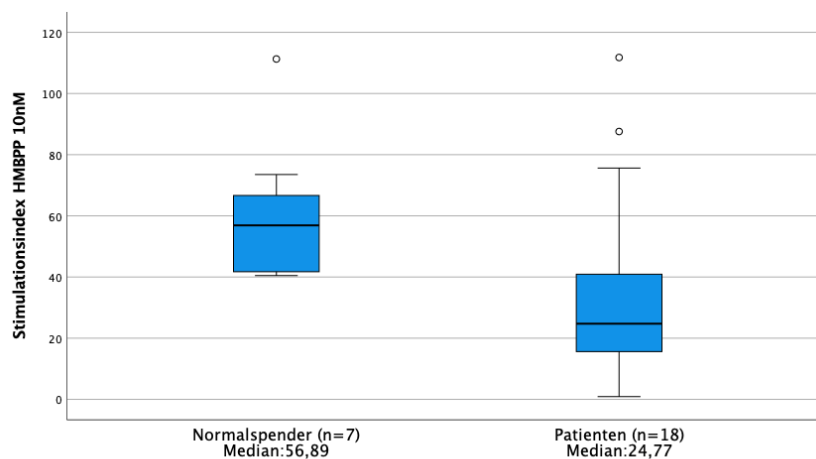


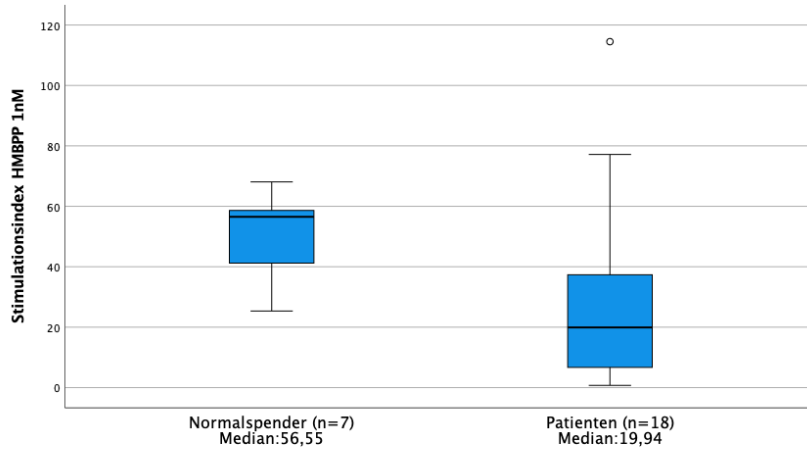
Abbildung 20: Graphische Darstellung der ermittelten SI-Mittelwerte für die Proliferation der Vδ2⁺ T-Zellen an Tag 8, Gegenüberstellung der SI-Mittelwerte der Normalspender (blau) und Tumorpatienten (grün) unter Verwendung der einzelnen Stimulanzen und ohne Stimulanzen. Die SI-Mittelwerte ermitteln sich aus den Dreifachbestimmungen.

Diese Ergebnisse werden auch in den nachstehenden Boxplots graphisch hervorgehoben und dargestellt.

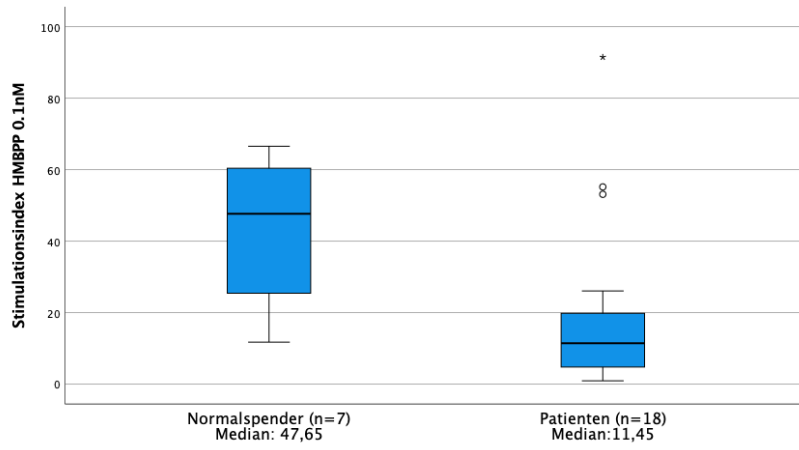
HMBPP 10nM (A)



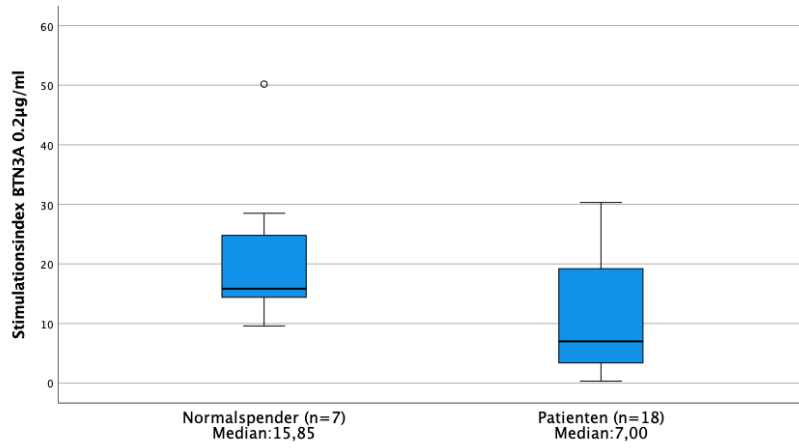
HMBPP 1nM (B)



HMBPP 0,1nM (C)



BTN3A 0,2µg/ml (D)



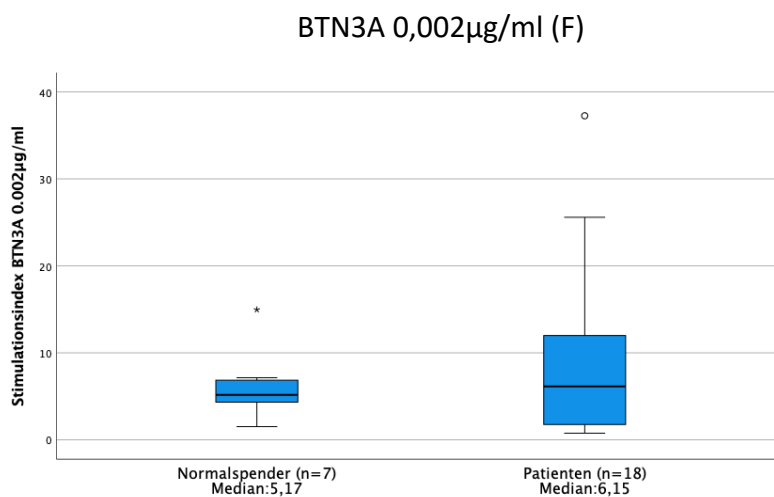
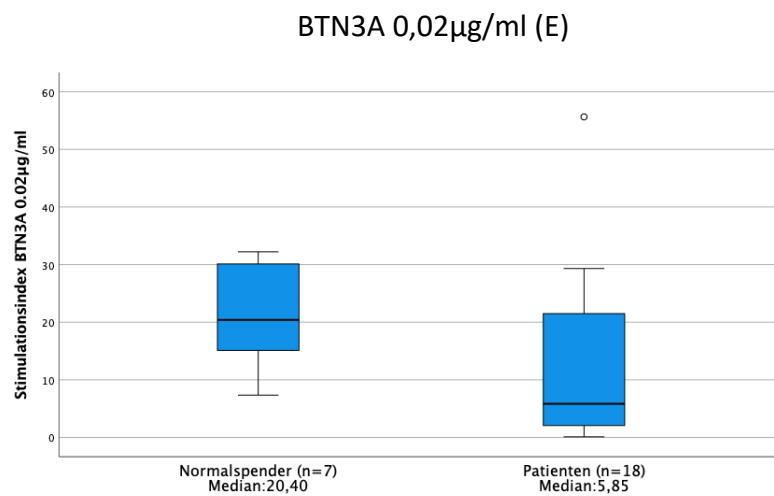


Abbildung 21: Vergleich der ermittelten Stimulationsindizes der $V\delta 2^+$ T-Zellproliferation an Tag 8 zwischen den Normalspendern und den Tumorpatienten unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen (HMBPP 10nM (A), HMBPP 1nM (B), HMBPP 0,1nM (C), BTN3A 0,2µg/ml (D), BTN3A 0,02µg/ml (E), BTN3A 0,002µg/ml (F)). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

Anhand der nachstehenden Tabelle wird der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kohorten anhand der berechneten Stimulationsindizes und des gewählten Cut Off Wertes von 5,0 für die Proliferation zusätzlich verdeutlicht. Es wird ersichtlich, dass die $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen der Normalspender deutlich besser proliferieren können (Tab. 13).

Hiernach ließen sich, mit Ausnahme bei dem verwendeten Stimulanz BTN3A 0,002µg/ml, 100 % aller Normalspender proliferieren, während bei den Tumorpatienten unter keinem der verwendeten Stimulanzen so eine Proliferation erzielt werden konnte.

Tabelle 13: Prozentuale Darstellung und Vergleich der Proliferationsfähigkeit mittels der unterschiedlichen Stimulanzen anhand der ermittelten Stimulationsindizes für die beiden untersuchten Kohorten.

	Normalspender	Tumorpatient	Normalspender	Tumorpatient
	% proliferiert		% nicht proliferiert	
<i>HMBPP 10nM</i>	100%	77,78%	0%	22,22%
<i>HMBPP 1nM</i>	100%	77,78%	0%	22,22%
<i>HMBPP 0,1nM</i>	100%	66,67%	0%	33,33%
<i>BTN3A 0,2µg/ml</i>	100%	61,11%	0%	38,89%
<i>BTN3A 0,02µg/ml</i>	100%	50%	0%	50%
<i>BTN3A 0,002µg/ml</i>	71,43%	50%	28,57%	50%

Um zu untersuchen, ob es einen signifikanten Anstieg der $V\delta 2^+$ T-Zellen zwischen Tag 0 und Tag 8 in der jeweiligen Kohorte gab, wurde der Wilcoxon-Tests durchgeführt. Es wurden stets die prozentualen $V\delta 2^+$ T-Zellwerte von Tag 0 mit den prozentualen $V\delta 2^+$ T-Zellwerten von Tag 8 unter Berücksichtigung der verschiedenen Stimulanzen untersucht. Bei den Normalspendern ergab sich in allen Vergleichen mit den unterschiedlichen Stimulanzen jeweils eine Signifikanz von $p=0,01$. Bei den Tumorpatienten ergab sich jeweils eine Signifikanz von $p=0,00$. Somit waren an Tag 8 die prozentualen $V\delta 2^+$ T-Zellen für beide Kohorten signifikant höher als an Tag 0. Kein signifikanter Unterschied konnte bei dem Vergleich der Negativkontrollen zwischen Tag 0 und Tag 8 ermittelt werden. Hier lagen die P-Werte für die Messungen der Normalspendern bei $p=0,17$ und für die Messungen der Tumorpatienten bei $p=0,72$. Diese Ergebnisse können nachstehender Tabelle 14 entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 33 (im Anhang) gedeutet werden.

Tabelle 14: Signifikanztest. Tabellarische Darstellung der ermittelten P-Werte (Asymptotische Signifikanz). Vergleich des prozentualer V δ 2⁺ T-Zellenanteils mit den unterschiedlichen Stimulanzen an Tag 8 und dem prozentualen V δ 2⁺ T-Zellenanteil ohne Stimulanzen an Tag 0 mittels Wilcoxon-Test, jeweils für Normalspender und Tumorpatienten. Die blau markierten Werte sind signifikante P-Werte (p<0,05). Deutung mittels Tabelle 33 im Anhang.

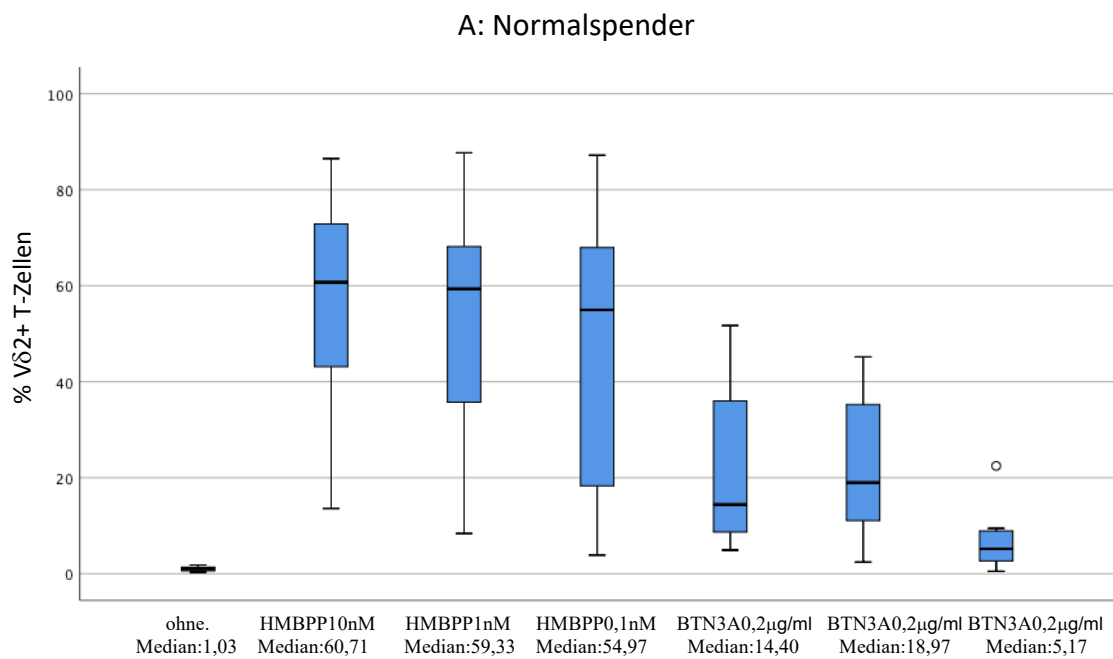
	Gruppe			
	Normalspender (n=7)		Patienten (n=18)	
	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d8 V δ 2 ⁺ ohne - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-1.352 ^b	.176	-.348 ^b	0.728
d8 V δ 2 ⁺ HMBPP 10nM - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-2.366 ^c	.018	-3.680 ^c	0.000
d8 V δ 2 ⁺ HMBPP 1nM - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-2.366 ^c	.018	-3.593 ^c	0.000
d8 V δ 2 ⁺ HMBPP 0,1nM - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-2.366 ^c	.018	-3.332 ^c	0.001
d8 V δ 2 ⁺ BTN3A 0.2 μ g/ml - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-2.366 ^c	.018	-3.549 ^c	0.000
d8 V δ 2 ⁺ BTN3A 0.02 μ g/ml - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-2.366 ^c	.018	-3.375 ^c	0.001
d8 V δ 2 ⁺ BTN3A 0.002 μ g/ml - d0 V δ 2 ⁺ ohne	-2.366 ^c	.018	-3.245 ^c	0.001

Um die Frage zu klären, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Tumorpatienten und Normal Spendern bezüglich ihrer Proliferationsfähigkeit gab, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Es zeigte sich bei HMBPP 0,1nM ein signifikanter Unterschied. Demnach proliferierten Normalspender signifikant besser als Tumorpatienten (p=0,04). Für die anderen Messungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (alle p>0,05) (siehe Tab. 15 und 34). Anhand der Tabelle 11 (Mittelwerte) kann jedoch eine bessere Proliferationsfähigkeit bei den Normal Spendern gegenüber den Tumorpatienten vernommen werden. Der prozentuale Anstieg der V δ 2 T-Zellen von Tag 8 ohne Stimuli auf den prozentualen Wert der V δ 2⁺ T-Zellen an Tag 8 mit Stimuli, fällt bei den Normal Spendern deutlich höher aus. Die stärkere Proliferationsfähigkeit der Normalspender kann auch graphisch anhand der Boxplots (Abb. 22) gut dargestellt werden.

Tabelle 15: Signifikanzberechnung. Darstellung der errechneten P-Werte (asymptotische Signifikanz) mittels Mann-Whitney-U-Test. Vergleich der Normalspender und der Tumorpatienten hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit ($V\delta 2^+$ T-Zellwerte) mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz. Blau markierte Werte sind signifikante P-Werte ($p < 0,05$). Deutung mittels Tabelle 34 im Anhang.

	Mann-Whitney-U	Wilcoxon-W	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d8 $V\delta 2^+$ ohne	43.000	71.000	-1.211	0.226
d8 $V\delta 2^+$ HMBPP 10nM	40.500	211.500	-1.362	0.173
d8 $V\delta 2^+$ HMBPP 1nM	42.000	213.000	-1.271	0.204
d8 $V\delta 2^+$ HMBPP 0,1nM	30.000	201.000	-1.997	0.046
d8 $V\delta 2^+$ BTN3A 0.2 μ g/ml	44.000	215.000	-1.150	0.250
d8 $V\delta 2^+$ BTN3A 0.02 μ g/ml	46.000	217.000	-1.029	0.304
d8 $V\delta 2^+$ BTN3A 0.002 μ g/ml	49.000	77.000	-0.847	0.397

Anhand der nachstehenden Boxplots wird die unterschiedliche Proliferationsfähigkeit der beiden Kohorten graphisch verdeutlicht und gegenübergestellt.



B: Tumorpatienten

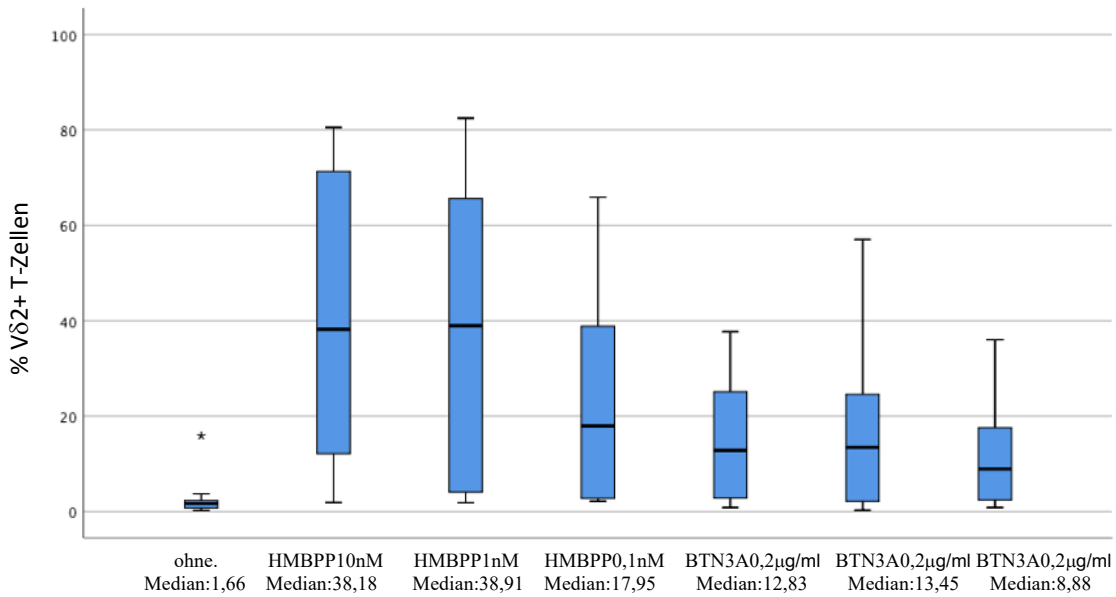
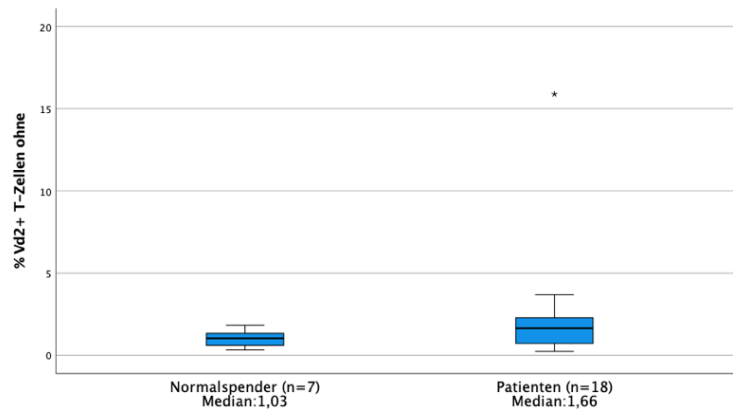


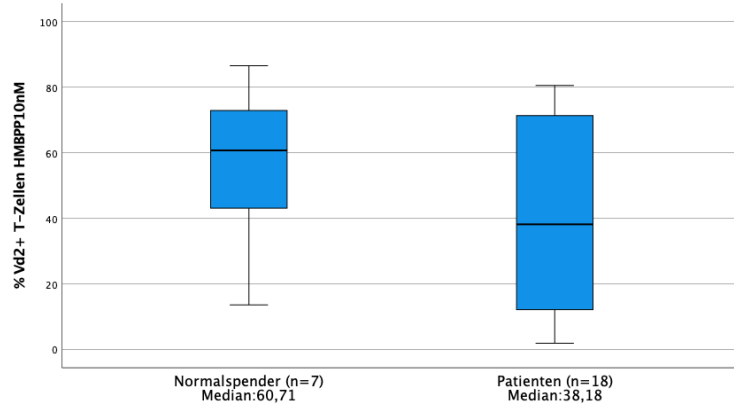
Abbildung 22: Darstellung der $V\delta 2$ T-Zellproliferation für die Normalspenderkohorte (A) und die Tumorpatientenkohorte (B) anhand der prozentualen $V\delta 2^+$ T-Zellmenge nach achttägiger Inkubation mit den unterschiedlichen Stimulanzen und dem Wachstumsfaktor IL2. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25.igste und 75.igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

Die folgenden Boxplots zeigen den direkten Vergleich der prozentualen $V\delta 2^+$ T-Zellproliferation zwischen den beiden Kohorten unter Verwendung der jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz an.

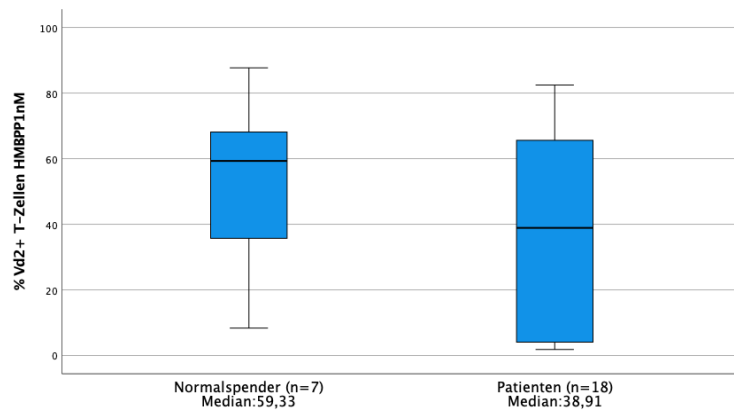
Tag 8: ohne Stimulanzen (A)



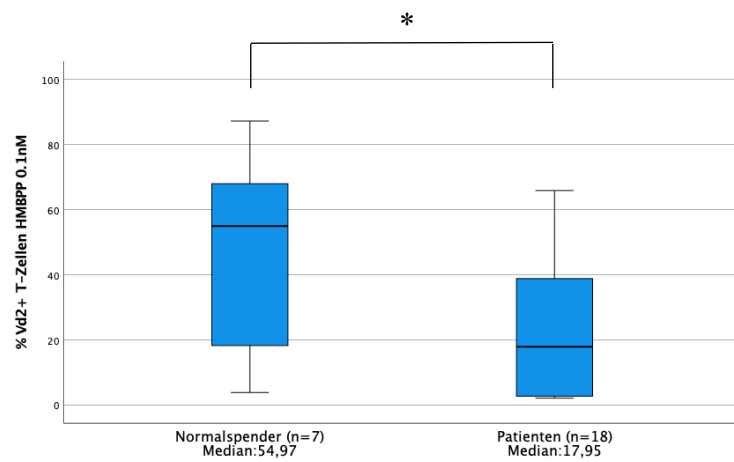
Tag 8: HMBPP 10nM (B)



Tag 8: HMBPP 1nM (C)



Tag 8: HMBPP 0,1nM (D)



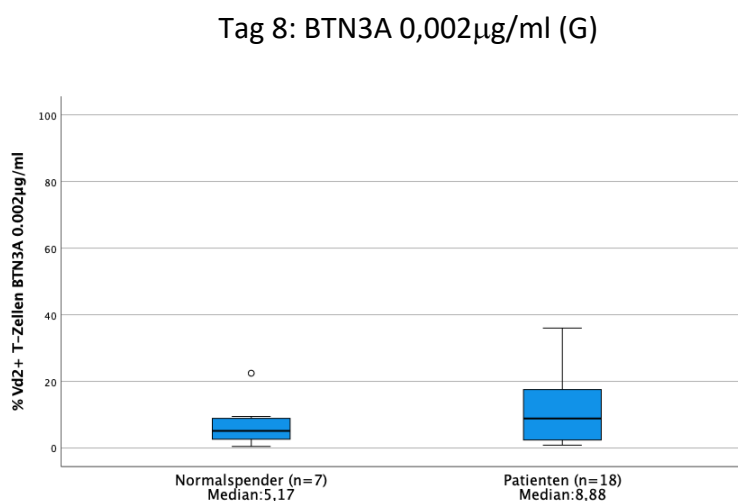
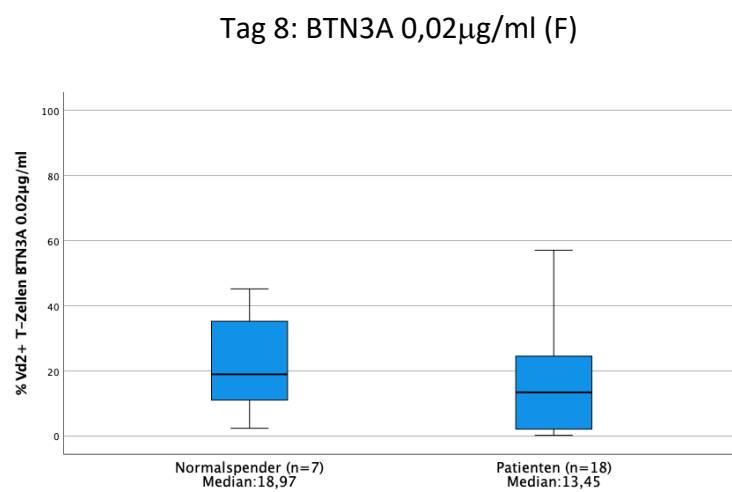
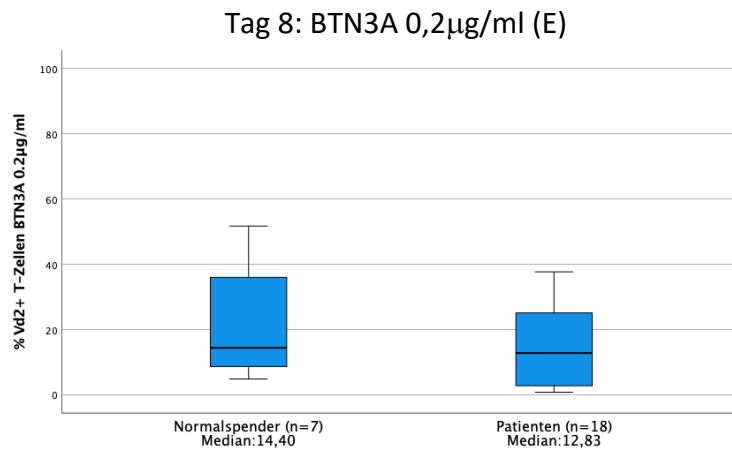


Abbildung 23: Darstellung der prozentualen Verteilung der proliferierten $V\delta 2^+$ T-Zellen nach achttägiger Inkubation bei Normalspendern und Tumorpatienten mit und ohne Stimulanzen (A-G) im Vergleich. Bei Abbildung D unter Verwendung der Stimulanz HMBPP 0,1nM ergibt sich ein signifikanter Unterschied *: $p=0,046$ (Mann-Whitney-U-Test, $p<0,05$): die Normalspender wiesen signifikant höhere $V\delta 2^+$ T-Zellmengen auf als die Tumorpatienten. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer

Des Weiteren wurde die Expression der Vδ2⁺ T-Zellen in beiden Kohorten an den Tagen 0 und 1 verglichen, um zu untersuchen, ob bereits hier womöglich signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten ersichtlich werden. An beiden Tagen fand diese Bestimmung ohne Zugabe exogener Faktoren und Stimulanzen statt. Es wurden die Negativkontrollen miteinander verglichen. Dabei wurden zum einen mittels des Wilcoxon Test die Vδ2⁺ T-Zellmenge an Tag 0 mit der gemessenen Menge an Tag 1 verglichen, dies für jede Kohorte getrennt. Dabei ergaben sich weder in der Kohorte der Normalspender noch in der Kohorte der Tumorpatienten signifikante Ergebnisse. Demnach konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Vδ2⁺ T-Zellmenge an Tag 0 und Tag 1 ermittelt werden. Die Ergebnisse können der nachfolgenden Tabelle (Tab. 16) entnommen werden.

Tabelle 16: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der Vδ2⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 0 und Tag 1. Signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, p<0,05). Deutung mittels Tabelle 35 im Anhang.

<i>Statistik für Test</i>		
Group		d1 Vδ2 ⁺ T-Zellen ohne - d0 Vδ2 ⁺ T-Zellen ohne
Normalspender	Z	-0.169 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.866
Patienten	Z	-0.329 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.695

Zum anderen wurde mittels des Mann-Whitney-U Test die beiden Kohorten untereinander verglichen, jeweils an Tag 0 und an Tag 1. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse (Tag 0 p=0,380 bzw. Tag 1 p=0,130) und demnach keine signifikanten Unterschiede zwischen den Normalspendern und den Tumorpatienten. Die ermittelten Ergebnisse können der nachstehenden Tabelle (Tab. 17) entnommen werden.

Tabelle 17: Signifikanzberechnung. Errechnete P-Werte (asymptotische Signifikanz) mittels Mann-Whitney-U-Test. Vergleich der Kohorten hinsichtlich ihrer Vδ2⁺ T-Zellwerte an Tag 0 und an Tag 1 mittels jeweils ohne Stimulanz (Negativkontrolle). Signifikante P-Werte (p<0,05). Deutung mittels Tabelle 36 im Anhang.

<i>Statistik für Test</i>		
	d0 Vδ2 ⁺ T-Zellen ohne	d1 Vδ2 ⁺ T-Zellen ohne
Mann-Whitney-U	48.500	38.000
Wilcoxon-W	76.500	66.000
Z	-0.878	-1.515
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.380	0.130

3.4 V γ 9V δ 2 T-Zell Subsets im Vergleich Normalspender vs. Tumorpatienten

Hinsichtlich der Frage zur Charakterisierung möglicher Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Normal Spendern bezüglich der Aktivierbarkeit und der Proliferation der V γ 9V δ 2 T-Zellen wurden die V δ 2 T-Zellen beider Gruppen genauer untersucht und V δ 2 T-Zell Subsets charakterisiert. Marker zur Definition von T-Zellsubpopulationen sind die Oberflächenmarker CD45RA und CD27.

Sie werden in naive (CD45RA⁺CD27⁺), central memory (CM) (CD45RA⁻CD27⁺), effector memory (EM) (CD45RA⁻CD27⁻) und terminal differenzierte effector memory (TEMRA) (CD45RA⁺CD27⁻) eingeteilt (76). Die Färbung mit den unterschiedlichen Antikörpern (siehe d0-Panel, Tab. 5, Kap. 2.1.4) und die durchflusszytometrischen Messungen fanden an Tag 0 aus dem Vollblut der Spender statt.

Die V δ 2⁺ T-Zellen wurden mittels PC7-markierten Antikörpern gegen CD27 und FITC-markierten Antikörpern gegen CD45RA durchflusszytometrisch in die vier Subsets eingeteilt. Die nachstehenden Beispiele der beiden Kohorten zeigen die Aufteilung in die Subgruppen (Abb. 24).

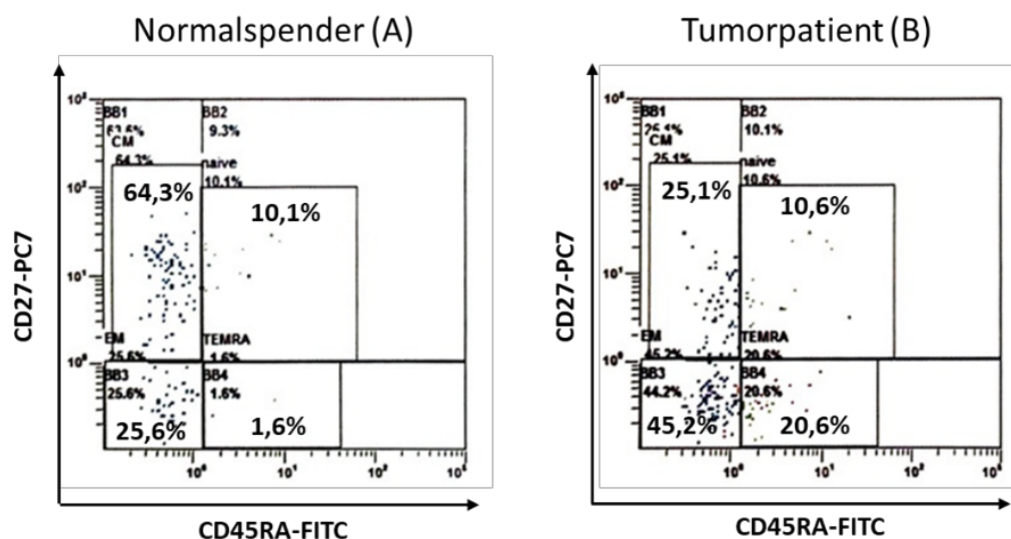


Abbildung 24: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Einteilung in die Subsets am Beispiel eines Normalspenders HD9 (A) und eines Tumorpatienten G17 (B). Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der jeweiligen Subsets.

Um mögliche signifikante Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Normalspendern charakterisieren zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet (Tab. 18).

Tabelle 18: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der unterschiedlichen Subsets im Vergleich zwischen Tumorpatienten und Normalspendern. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte hervor. Deutung mittels Tabelle 37 im Anhang.

	naive Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	CM Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	EM Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁻)	TEMRA Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁻)
Mann-Whitney-U	31.000	40.000	20.000	56.000
Wilcoxon-W	202.000	211.000	48.000	84.000
Z	-1.938	-1.393	-2.602	-0.424
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.053	0.164	0.009	0.672

Dabei ergab sich eine unterschiedliche Verteilung der Vδ2 T-Zell Subsets zwischen den Kohorten. Bei den Normalspendern konnte im Vergleich zu den Tumorpatienten eine signifikant höhere Anzahl an naiven Vδ2⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (p=0,05; Abb. 25).

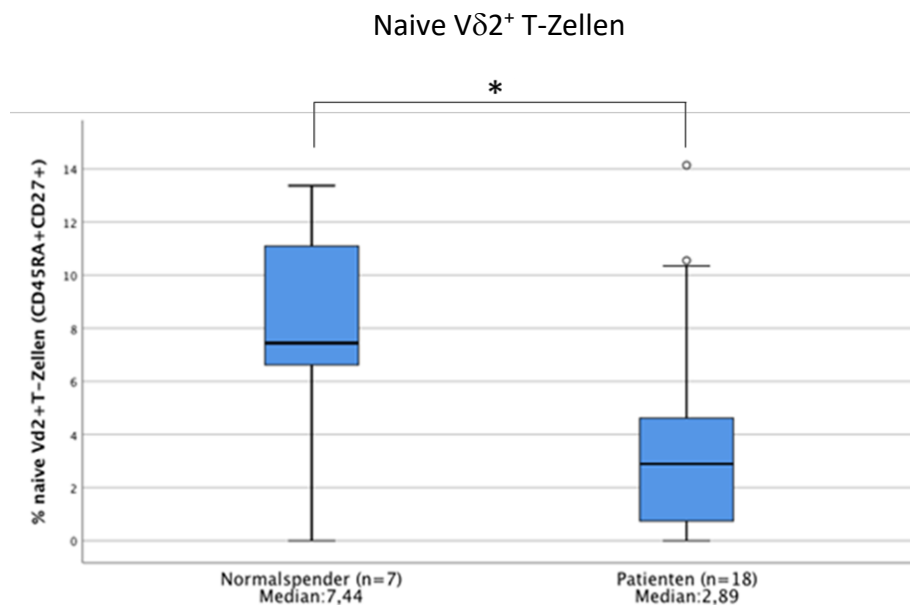


Abbildung 25: Prozentuale Anteile an naiven Vδ2⁺ T-Zellen zwischen Normalspendern und Tumorpatienten im Vergleich. *: p=0,05: Normalspender haben eine signifikant höhere Anzahl an naiven T-Zellen. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Kreis: leichter Ausreißer

Ein weiterer signifikanter Unterschied bei der Verteilung ergab sich für die Untergruppe der EMs. Hierbei hatten die Tumorpatienten eine signifikant höhere Anzahl an EM Vδ2⁺ T-Zellen als die Normalspender (p=0,00; Abb. 26).

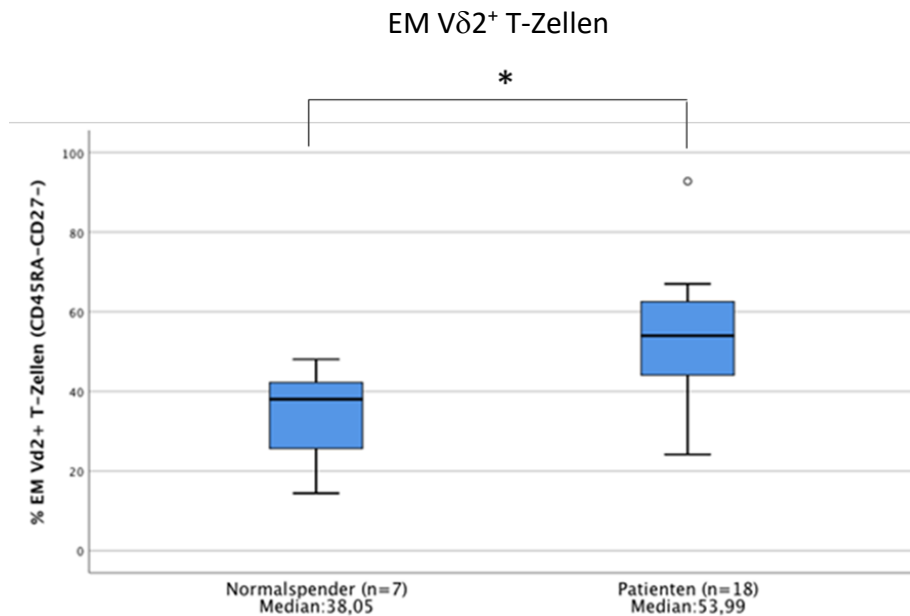


Abbildung 26: Vergleich der prozentualen Anteile an effector memory Vδ2⁺ T-Zellen zwischen Normalspendern und Tumorpatienten. *: p=0,00: Tumorpatienten haben eine signifikant höhere Anzahl an effector memory T-Zellen. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Kreis: leichter Ausreißer

Bei der Untersuchung der beiden weiteren Untergruppen (CM und TEMRA) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kohorten. Die P-Werte lagen bei p=0,16 für CM und bei p=0,67 für TEMRA (Abb. 27).

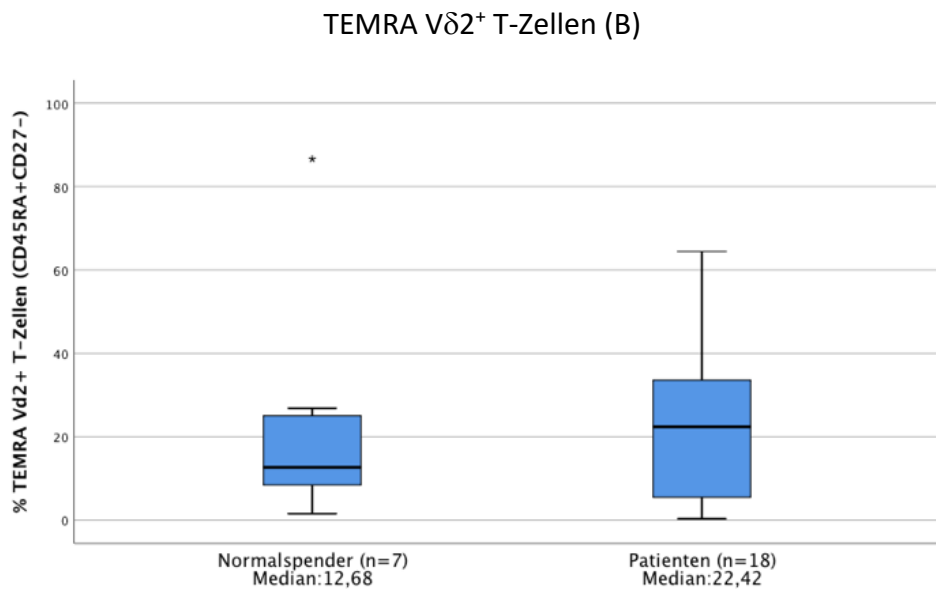
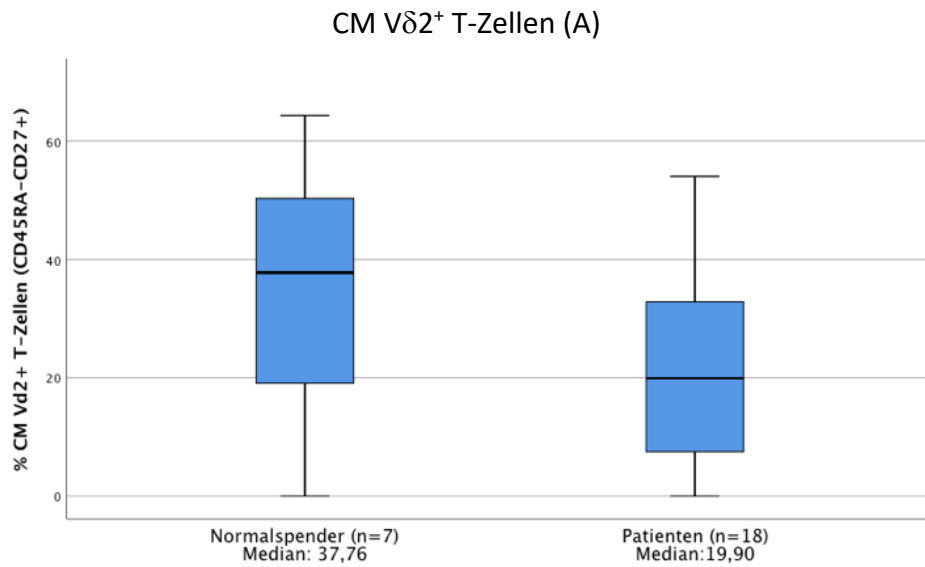


Abbildung 27: Vergleich der prozentualen Anteile an CM (A) bzw. TEMRA (B) Vδ2⁺ T-Zellen zwischen Normalspendern und Tumorpatienten. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer

In der Kohorte der Tumorpatienten ließ sich demnach eine deutliche Verschiebung der Vδ2 T-Zellsubgruppen in Richtung differenzierter Subsets (EM Vδ2 T-Zellen) nachweisen, während in der Kohorte der Normalspender wiederum eine deutliche Verschiebung in Richtung nicht differenzierter Subsets (naive und CM Vδ2 T-Zellen) zu vermerken war

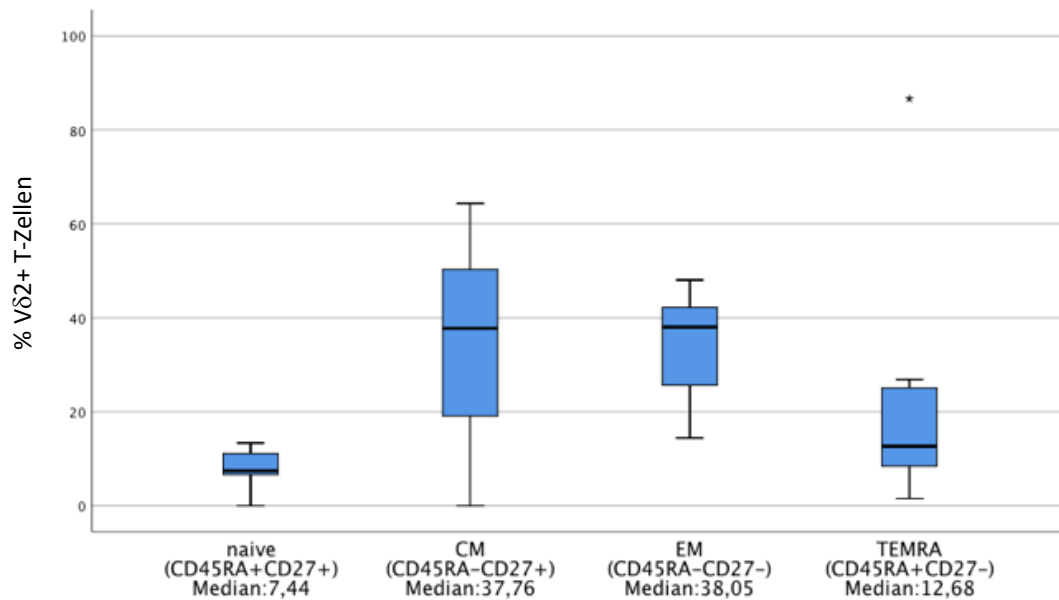
(Abb. 28). Diese Verteilung wird auch anhand der Mittelwerte für die Subgruppen ersichtlich und kann der Tabelle 19 entnommen werden.

Tabelle 19: Darstellung der Variablen der V δ 2 T-Zell Subsets an Tag 0, gelb markierte Werte stellen die Mittelwerte der unterschiedlichen Subgruppen jeweils für Tumorpatienten und Normalspender dar.

	Gruppe									
	Normalspender (n=7)					Patienten (n=18)				
	Mean	SD	Min	Median	Max	Mean	SD	Min	Median	Max
naive V δ 2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	8.03	4.44	0.00	7.44	13.37	3.84	4.03	0.00	2.89	14.14
CM V δ 2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁻ CD27 ⁺)	34.42	22.86	0.00	37.76	64.34	21.04	15.65	0.00	19.90	54.02
EM V δ 2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁻ CD27 ⁻)	33.76	12.15	14.43	38.05	48.06	53.10	16.49	24.14	54.00	92.76
TEMRA V δ 2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁻)	23.97	29.00	1.55	12.68	86.60	23.45	18.44	0.37	22.42	64.42

Die nachstehenden Boxplots verdeutlichen die Verschiebung der V δ 2 T-Zell Subsets in Richtung EM und TEMRA bei den Tumorpatienten.

A: Normalspender (n=7)



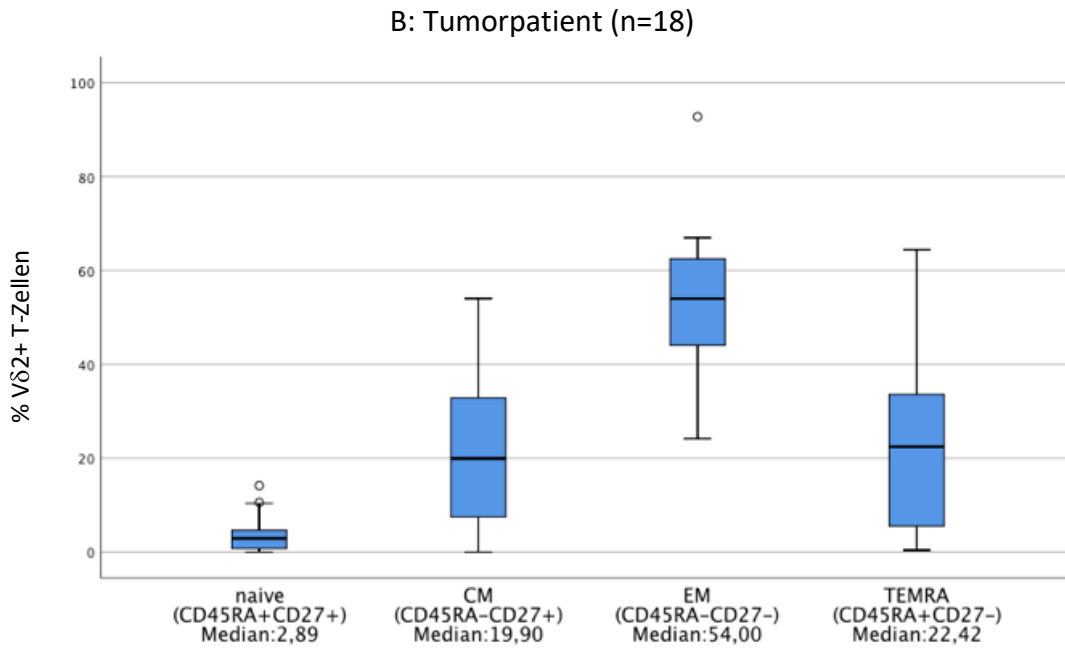


Abbildung 28: Darstellung der unterschiedlichen $V\delta 2^+$ T-Zell-Subgruppen für Normalspender (A) und Tumorpatienten (B). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer, Kreis: leichter Ausreißer.

Auch mittels einer weiteren möglichen Unterteilung wurden die $V\delta 2^+$ T-Zellen untersucht. Diese unterteilt die $V\delta 2^+$ T-Zellen in sechs Profile anhand deren Oberflächenexpression von CD27, CD28 sowie CD16. Sie werden in $\gamma\delta^{(28+)}$ ($CD28^+CD27^+CD16^-$), $\gamma\delta^{(28-)}$ ($CD28^-CD27^+CD16^-$), $\gamma\delta^{(16-)}$ ($CD28^-CD27^-CD16^-$) und $\gamma\delta^{(16+)}$ ($CD28^-CD27^-CD16^+$) eingeteilt. Anhand der prozentualen Verteilung der Expression der Oberflächenantigene, werden die Profile vergeben. Demnach wurden anhand der relativen Verteilung der Untergruppen $\gamma\delta(28+)$, $\gamma\delta(28-)$, $\gamma\delta(16+)$ und $\gamma\delta(16-)$ die insgesamt 6 Profile definiert (77). Mit Hilfe dieser Unterteilung kann eine mögliche Aussage bezüglich der Effektorfunktionen der $V\delta 2$ T-Zellen des Spenders getroffen werden (77). Je mehr $CD16^+$ $V\delta 2$ T-Zellen und gleichzeitig mehr $CD27^- CD28^+$ $V\delta 2$ T-Zellen vorhanden sind, desto höher ist das Profil. Je weniger $CD16^+$ $V\delta 2$ T-Zellen und gleichzeitig je mehr $CD27^+ CD28^+$ $V\delta 2$ T-Zellen, desto kleiner das Profil. Dies wird auch anhand der Abbildung 29 ersichtlich. Die Messungen fanden auch hier durchflusszytometrisch mittels ECD-markierten Antikörper gegen CD28, PC7-markierten

Antikörper gegen CD27 und PE-markierten Antikörper gegen CD16 statt. Exemplarische Beispiele sind nachstehend in Abbildung 29 für beide Kohorten dargestellt.

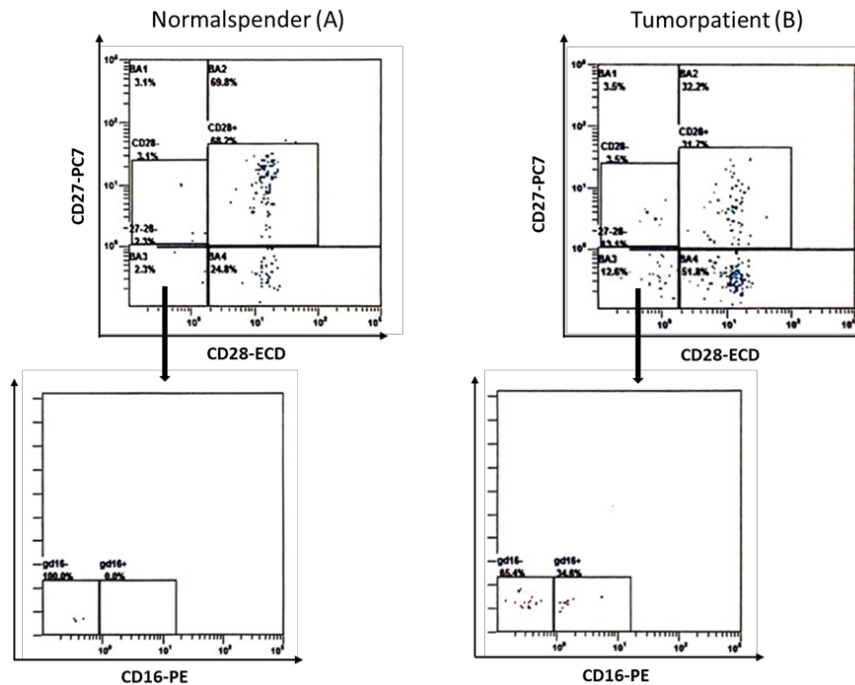


Abbildung 29: Repräsentative FACS-Analyse des Profils 2 (A) und des Profils 4 (B) bei einem Normalspender (HD9) und einem Tumorpatienten (GI7).

Anhand der Verteilung der Oberflächenantigene wurden jedem untersuchten Spender eins der sechs Profile zugeordnet, welches der nachstehenden Tabelle 20 entnommen werden kann. Es zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Profile zwischen den beiden Kohorten, wobei sich eine Tendenz in Richtung Profil 1 und 2 bei den Normalspender und eine Tendenz in Richtung Profil 3 und 4 bei den Tumorpatienten präsentierte.

Tabelle 20: Verteilung der Vδ2⁺ Profile bei den Normalspendern und den Tumorpatienten.

Gruppe	Normalspender (n=7 100%)	Anzahl	Vδ2 ⁺ Profile					
			1	2	3	4	5	6
		% innerhalb der Gruppe	14.3%	71.4%	14.3%	0.0%	0.0%	0.0%
	Patienten (n=18 100%)	Anzahl	0	4	8	5	1	0
		% innerhalb der Gruppe	0.0%	22.2%	44.4%	27.8%	5.6%	0.0%
Gesamt (n=25 100%)		Anzahl	1	9	9	5	1	0
		% innerhalb der Gruppe	4.0%	36.0%	36.0%	20.0%	4.0%	0.0%

3.5 Weitere Aktivierungs-relevante Oberflächenantigene auf V γ 9V δ 2 T-Zell im Vergleich Normalspender vs. Tumorpatienten

Um weitere Aussagen über mögliche Unterschiede zwischen den Normal Spendern und den Tumorpatienten treffen zu können und mögliche Ursachen für diese Unterschiede identifizieren zu können, wurden deren V δ 2 T-Zellen auf die Expression weitere Oberflächenmoleküle untersucht. Dabei handelte es sich um CD161, CD39 und PD1 (78–80). Alle drei Oberflächenmoleküle werden auf unterschiedlichen Immunzellen exprimiert und gelten auch auf V γ 9V δ 2 T-Zellen als wichtige Oberflächenmarker (81–83). CD161 gehört zur C-Typ Lektin Superfamilie und ist ein Typ II homodimeres Oberflächenprotein (84). Bei dem Oberflächenmolekül CD39 handelt es sich um eine Ekto-ATPase, welche ATP und ADP zu Adenosin und Phosphat hydrolysiert (74). Das programmierte Zelltod-1 (PD-1) Membranprotein gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (85) und spielt als inhibitorischer Rezeptor eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell Aktivierung.

Zur Bestimmung der Oberflächenexpressionen wurden die in Kultur genommenen PBMCs der Kohorten sowohl an Tag 1 als auch an Tag 8 mit den entsprechenden Antikörperkombinationen gefärbt (siehe d1- und d8-Panel, Tab. 5, Kap. 2.1.4) und durchflusszytometrisch bestimmt.

Hierbei stellte sich zum einen die Frage, wie sich die Expression der jeweiligen Oberflächenmoleküle grundsätzlich über die Messzeitpunkte (Tag 1 und Tag 8) verhält. In Hinblick darauf wurden die Werte der Expression für die unterschiedlichen Tage ohne Stimulanzen miteinander verglichen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob es unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen an den unterschiedlichen Tagen zu Veränderungen der Expression auf den V δ 2 T-Zellen kommt und ob hier ein Unterschied zwischen den beiden Kohorten zu vermerken ist.

Für die Messung der CD161⁺ Vδ2 T-Zellen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Sowohl für die Normalspender als auch für die Tumorpatienten ergaben sich signifikante Ergebnisse bei dem Vergleich der Oberflächenexpression von CD161 zwischen Tag 1 und Tag 8 (P-Werte p= 0,01 für Normalspender, p=0,00 für Tumorpatienten). Für beide Kohorten lag hier an Tag 8 eine höhere CD161 Expression vor. Dies kann der nachstehenden Tabelle 21 entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 38 (siehe Anhang) gedeutet werden.

Tabelle 21: Signifikanztest, Darstellung der p-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 1 und Tag 8. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 38 im Anhang.

Statistik für Test		d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne
		—
Group		d1 CD161 ⁺ -Vδ2 ⁺ ohne
Normalspender	Z	-2.366 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.018
Patienten	Z	-3,724 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.000

Für die Messungen der CD39⁺ Vδ2 T-Zellen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Für die CD39 Expression auf den Vδ2 T-Zellen ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei der CD161 Expression. Auch hier hatten sowohl die Normalspender als auch die Tumorpatienten an Tag 8 signifikant höhere CD39⁺ Vδ2 T-Zellen als an Tag 1 (p=0,01 bzw. p=0,00). Die Werte können den nachstehenden Tabellen (Tab. 22 und 39 (siehe Anhang)) entnommen werden.

Tabelle 22: Signifikanztest, Darstellung der p-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 1 und Tag 8. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 39 im Anhang.

Statistik für Test		d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne
		—
Group		d1 CD39 ⁺ -Vδ2 ⁺ ohne
Normalspender	Z	-2.366 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.018
Patienten	Z	-3.680 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.000

Für die Messungen der PD1⁺ Vδ2 T-Zellen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Auch bei dem Vergleich der PD1 Expression zwischen den beiden Kohorten ergaben sich für beide signifikant höhere Werte an Tag 8. Auch hier können die ermittelten Ergebnisse aus den nachstehenden Tabellen (Tab. 23 und 40 (siehe Anhang)) abgelesen werden.

Tabelle 23: Signifikanztest, Darstellung der p-Werte (asymptotische Signifikanz) der PD1⁺ Vδ2⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 1 und Tag 8. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 40 im Anhang.

<i>Statistik für Test</i>		d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne
		-
Group		d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne
Normalspender	Z	-2,366 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.018
Patienten	Z	-3,680 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.000

Um des Weiteren Rückschlüsse ziehen zu können, ob sich die Menge der Oberflächenmoleküle auf den Vδ2 T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen veränderten, wurde an Tag 1 und an Tag 8 deren Expression gemessen. An Tag 1 wurden gleiche Stimulanzen und Konzentrationen wie bei der Bestimmung der Aktivierung (HMBPP 10nM, BTN3A 20.1 0,2µg/ml, sc20.1 2µg/ml), an Tag 8 gleiche Stimulanzen und Konzentrationen wie bei der Messung der Proliferation (HMBPP 10nM, 1nM, 0,1nM; BTN3A 20.1 0,2µg/ml, 0,02µg/ml, 0,002µg/ml) gewählt.

Für Tag 1 wurden die Messergebnisse mittels des Wilcoxon-Tests untersucht. Die Untersuchung verglich die Messergebnisse der Negativkontrollen (ohne Stimulanzen) mit den Messergebnissen der jeweils verwendeten Stimulanzen.

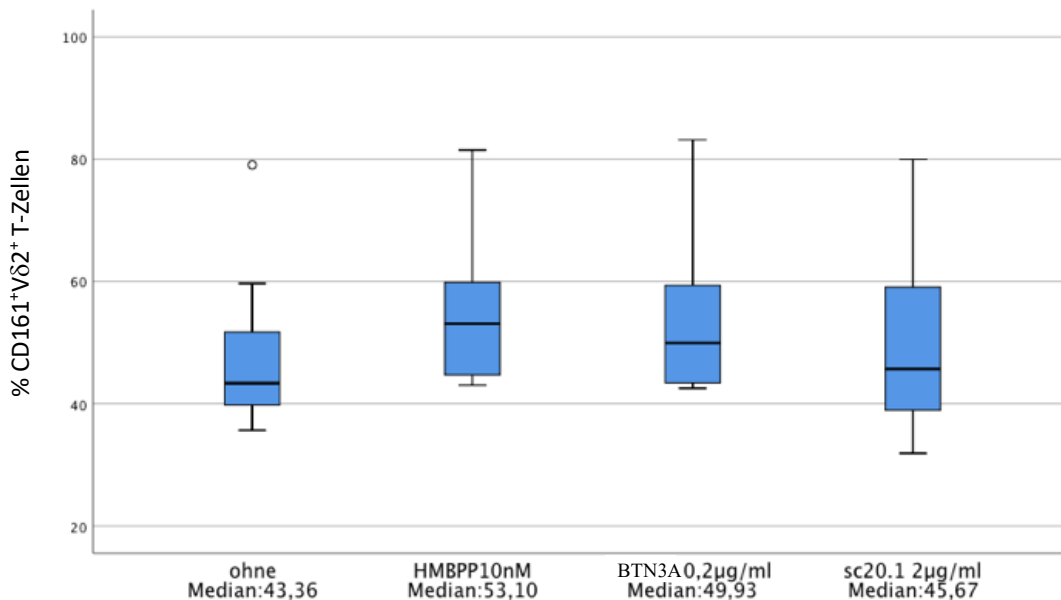
Für die CD161⁺ Vδ2 T-Zellen ergaben sich bei den Normal Spendern zwei signifikante Unterschiede. Die Normal Spender zeigten an Tag 1 signifikant höhere CD161⁺ T-Zellen unter Verwendung des Stimulanz HMBPP 10nM sowie des BTN3A 0,2µg/ml als ohne Stimulierung. Der P-Wert lag bei beiden signifikanten Werten bei p=0,01 (Tab. 24).

Auch bei den Tumorpatienten ergaben sich zwei signifikante Unterschiede. Die CD161 Expression auf den Vδ2 T-Zellen war mit HMBPP 10nM an Tag 1 signifikant niedriger als die der Negativkontrolle (p=0,01). Die Expression von CD161 unter BTN3A 0,2µg/ml war signifikant höher als ohne (P-Wert p= 0,02). Bei sc20.1 2µg/ml ergaben sich für keine der beiden Kohorten signifikante Unterschiede. Die Ergebnisse können der Tabelle 24 entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 41 gedeutet werden.

Tabelle 24: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 1 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 41 im Anhang.

Statistik für Test		d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml
Group		d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne
Normalspender	Z	-2.366 ^b	-2.366 ^b	-0.845 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.018	0.018	0.398
Patienten	Z	-2.461 ^b	-2.243 ^b	-0.639 ^a
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.014	0.025	0.523

A: Normalspender CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen



B: Tumorpatienten CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen

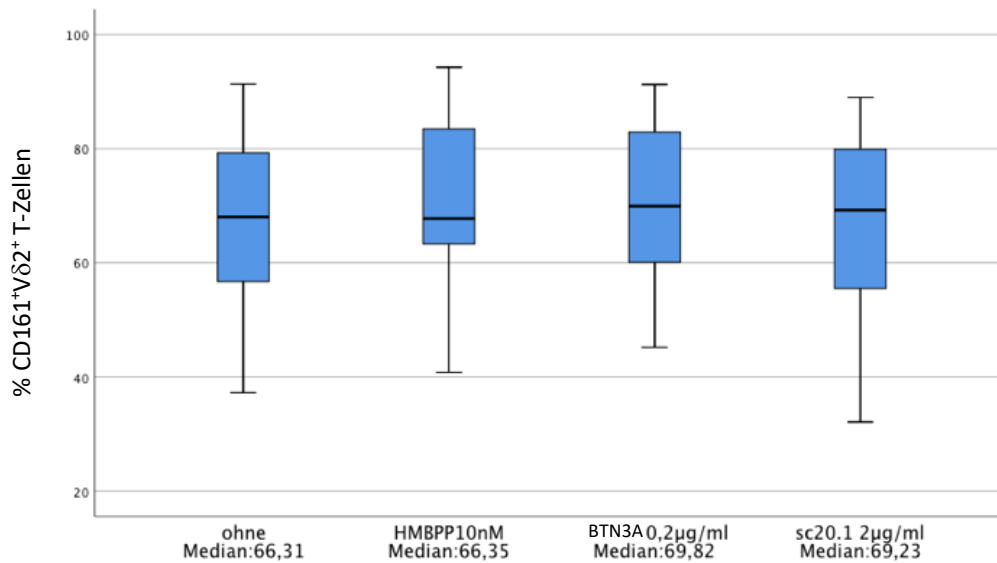


Abbildung 30: Prozentuale Darstellung der CD161 Expression auf den Vδ2⁺ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 1 für die Normalspender (A) und die Tumorpatienten (B). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{igste} und 75^{igste} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Kreis: leichter Ausreißer.

Für die CD39 Expression auf den Vδ2 T-Zellen an Tag 1 ergaben sich in beiden Kohorten signifikante Unterschiede. Die Normalspender wiesen eine signifikant höhere Expression unter HMBPP 10nM ($p=0,04$), die Tumorpatienten eine signifikant höhere Expression unter HMBPP 10nM ($p=0,00$) und BTN3A 0,2µg/ml ($p=0,04$) auf.

Bei sc20.1 2µg/ml fanden sich im Vergleich zur Negativkontrolle für keine der beiden Kohorten signifikante Unterschiede, ebenso keine für die Normalspender bei BTN3A 20.1 Stimulation. Die Ergebnisse können der Tabelle 25 entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 42 (siehe Anhang) gedeutet werden.

Tabelle 25: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 1 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, $p<0,05$) hervor. Deutung mittels Tabelle 42 im Anhang.

Statistik für Test		d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml
Group		d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne
Normalspender	Z	-2.028 ^b	-0.339 ^c	-1.183 ^c
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.043	0.734	0.237
Patienten	Z	-3.201 ^b	-1.982 ^b	-0.403 ^c
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.001	0.048	0.687

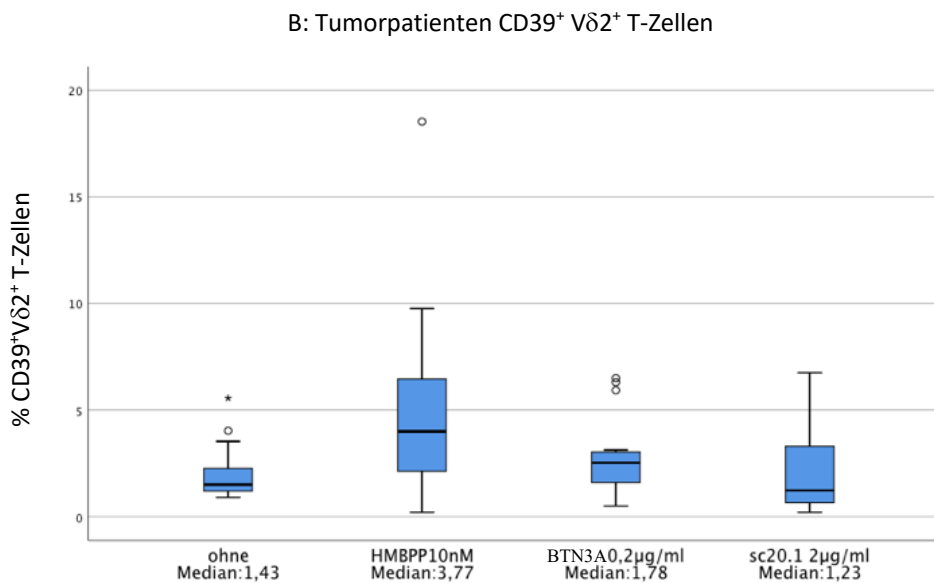
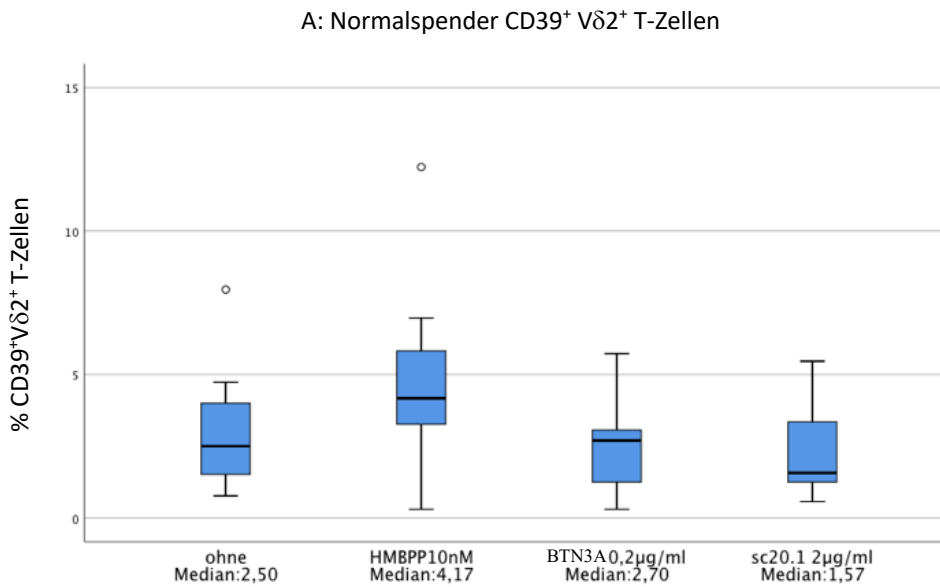


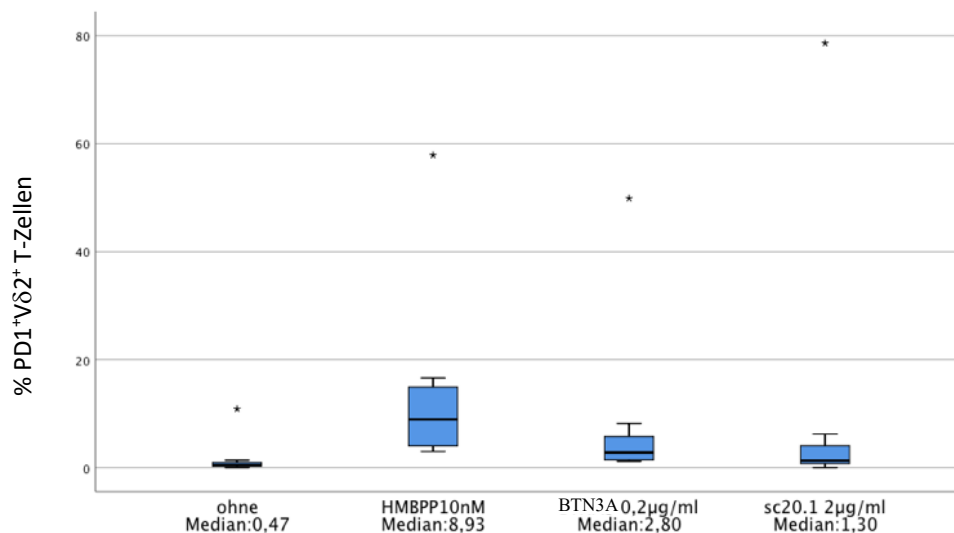
Abbildung 31: Prozentuale Darstellung der CD39 Expression auf den Vδ2⁺ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 1 für die Normalspender (A) und die Tumorpatienten (B). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extreme Ausreißer; Kreis: leichte Ausreißer.

Die PD1 Expression ergab in beiden Kohorten signifikant höhere Werte unter Verwendung der Stimulanzen. Bei den Normalspendern lag eine Signifikanz bei HMBPP 10nM ($p=0,01$), bei BTN3A 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p=0,01$) und sc20.1 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p=0,02$) vor, bei den Tumorpatienten bei HMBPP 10nM ($p= 0,00$) und BTN3A 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p=0,00$). Für die Tumorpatienten ergab sich bei sc20.1 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ein schwach signifikanter Wert und somit eine schwach signifikant ($p<0,1$) höhere PD1 Expression. Alle ermittelten P-Werte können der Tabelle 26 entnommen werden und mit der Tabelle 43 interpretiert werden.

Tabelle 26: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der PD1⁺ V δ 2⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 1 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, $p<0,05$) hervor. Deutung mittels Tabelle 43 im Anhang.

Statistik für Test		d1 PD1 ⁺ V δ 2 ⁺ HMBPP10nM -	d1 PD1 ⁺ V δ 2 ⁺ BTN3A 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -	d1 PD1 ⁺ V δ 2 ⁺ sc20.1 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -
Group		d1 PD1 ⁺ V δ 2 ⁺ ohne	d1 PD1 ⁺ V δ 2 ⁺ ohne	d1 PD1 ⁺ V δ 2 ⁺ ohne
Normalspender	Z	-2.366 ^b	-2.366 ^c	-2.201 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.018	0.018	0.028
Patienten	Z	-3.103 ^b	-3.332 ^b	-1.862 ^b
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.002	0.001	0.063

A: Normalspender PD1⁺ V δ 2⁺ T-Zellen



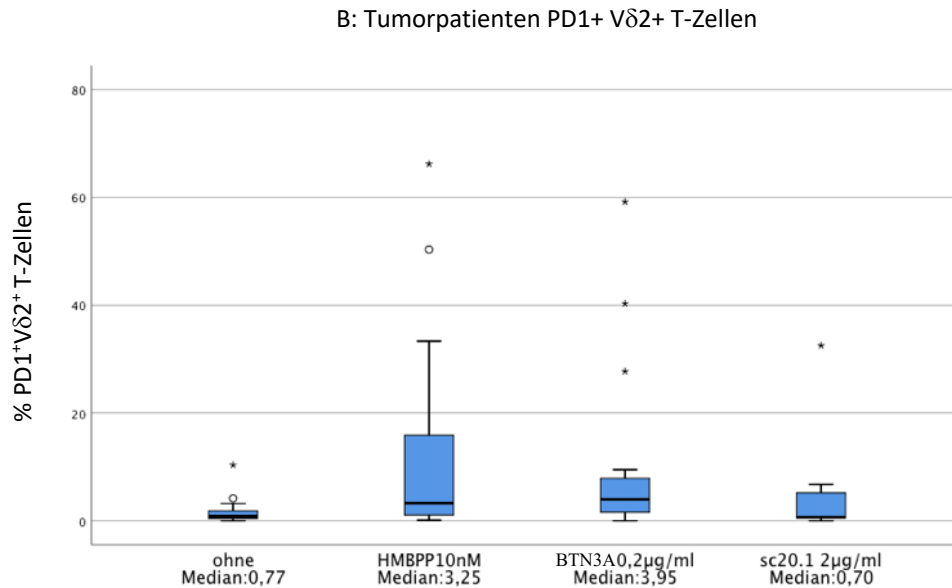


Abbildung 32: Prozentuale Darstellung der PD1 Expression auf den Vδ2⁺ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 1 für die Normalspender (A) und die Tumorpatienten (B). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

Um die Frage zu beantworten, wie und ob sich die Expression der Oberflächenmoleküle auf den Vδ2 T-Zellen an Tag 8 veränderten, wurden auch hier die Messergebnisse mittels des Wilcoxon-Tests untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse mit den jeweiligen Stimulanzen jeweils mit der Negativkontrolle verglichen.

Für die Expression von CD161 auf Vδ2 T-Zellen ergaben sich sowohl für die Normalspender als auch für die Tumorpatienten einige signifikante Ergebnisse. Für die Normalspender stieg die CD161 Expression auf den Vδ2 T-Zellen unter Verwendung aller Stimulanzen, mit Ausnahme von BTN3A 0,2 µg/ml, signifikant an.

Bei den Tumorpatienten ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Hier stieg die CD161 Expression auf den Vδ2 T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle bei fünf von sechs verwendeten Stimulanzen signifikant an, für HMBPP 1nM ergab sich jedoch ein signifikant höheres Ergebnis für die Negativkontrolle.

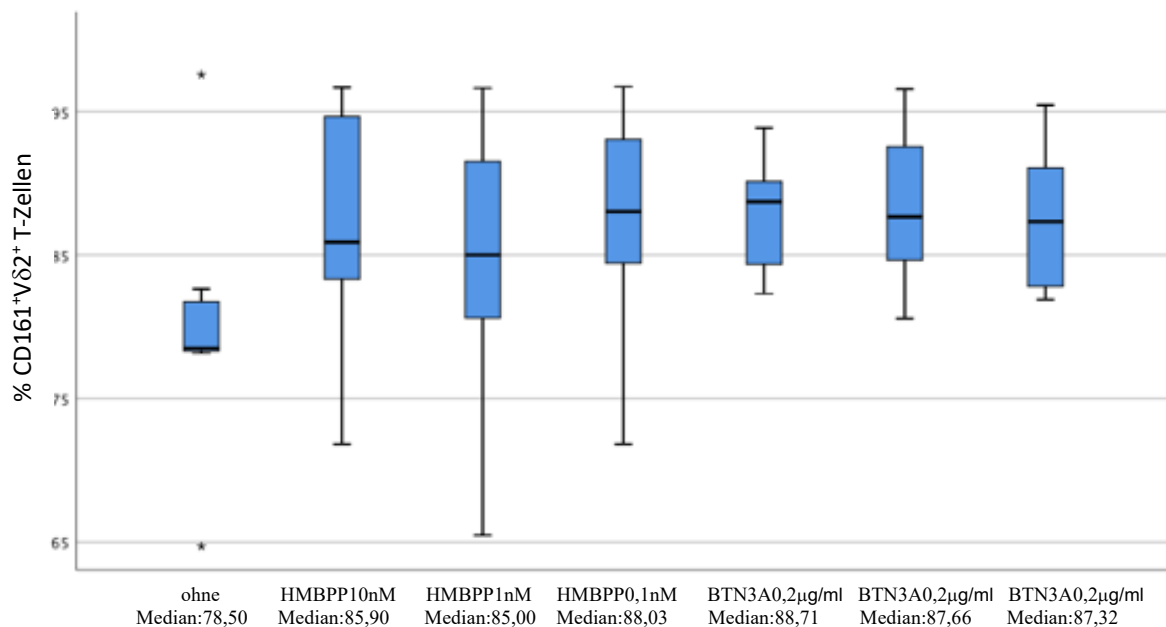
Die P-Werte können der nachstehenden Tabelle 27 entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 44 (siehe Anhang) genauer gedeutet werden.

Tabelle 27: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 8 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon-Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 44 im Anhang.

Statistik für Test

	Gruppe			
	Normalspender		Patienten	
	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 10nM – d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-3.419 ^b	0.001
d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 1nM – d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.028 ^b	0.043	-1.982 ^b	0.048
d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 0,1nM – d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-1.894 ^b	0.058
d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2μg/ml – d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-1.521 ^b	0.128	-3.114 ^b	0.002
d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,02μg/ml – d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-1.982 ^b	0.048
d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,002μg/ml – d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-2.286 ^b	0.022

A: Normalspender CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen



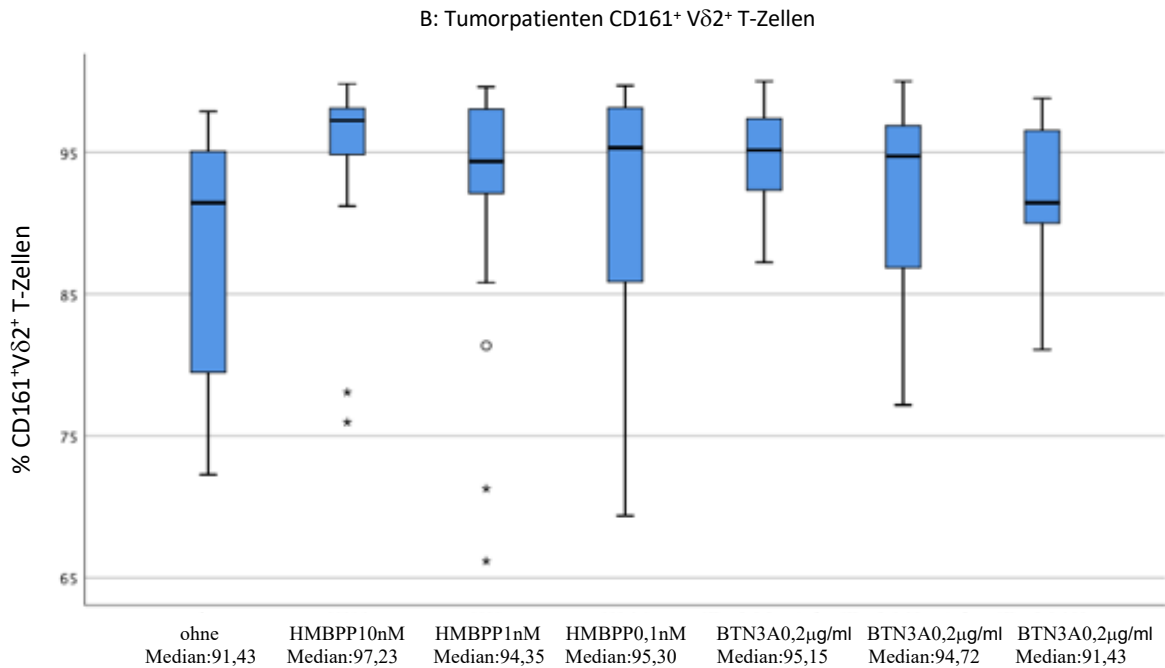


Abbildung 33: Prozentuale Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen und ohne Stimulanz für die Normalspender (A) und die Tumorpatienten (B) an Tag 8. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extreme Ausreißer, Kreis: leichter Ausreißer.

Für die CD39 Expression konnte bei allen Vergleichen in beiden Gruppen ein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Für alle verwendeten Stimulanzen lag die Expression an Tag 8 mit Stimulanz signifikant höher als ohne Stimulanz. Die Ergebnisse können auch hier der nachstehenden Tabelle 28 entnommen werden und mit Hilfe der Tabelle 45 der mittleren Ränge (siehe Anhang) gedeutet werden.

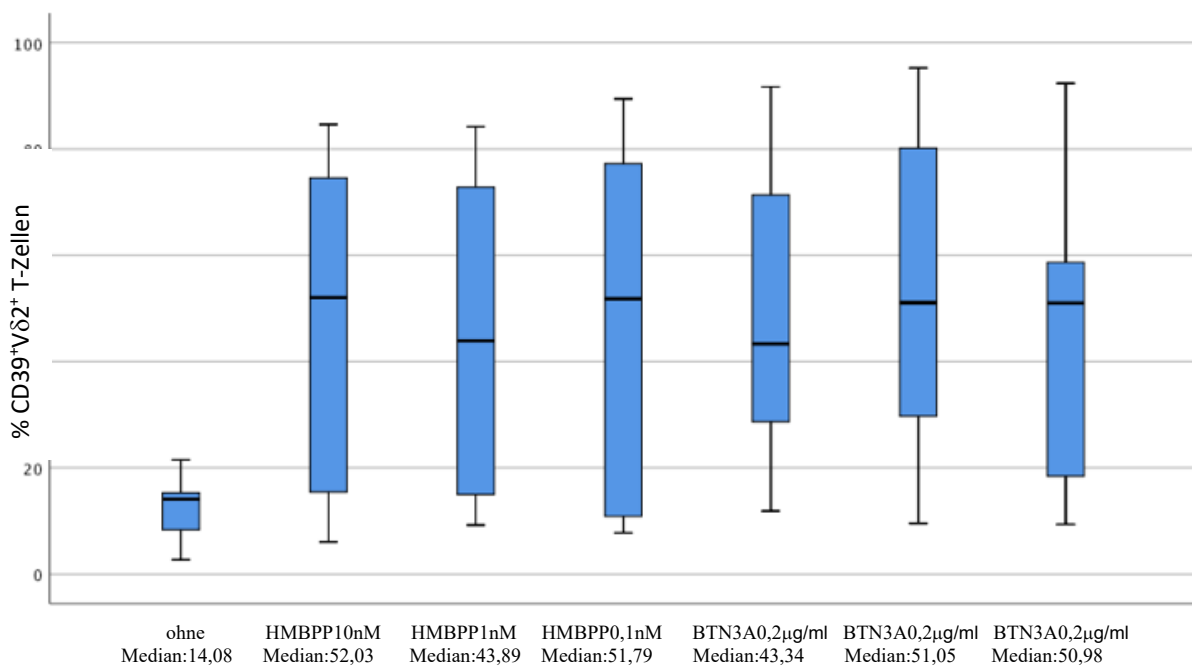
Tabelle 28: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 8 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 45 im Anhang.

Statistik für Test

	Gruppe			
	Normalspender		Patienten	
	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 10nM – d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-3.636 ^b	0.000
d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 1nM – d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-3.636 ^b	0.000
d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 0,1nM – d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.197 ^b	0.028	-3.636 ^b	0.000
d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml – d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2,366 ^b	0.018	-3.724 ^b	0.000
d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml – d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.366 ^b	0.018	-3.724 ^b	0.000
d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml – d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	-2.366 ^b	0.018	-3.724 ^b	0.000

Anhand der nachstehenden Boxplots wird die gesteigerte CD39 Expression unter Verwendung der Stimulanzen für beide Kohorten graphisch dargestellt.

A: Normalspender CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen



B: Tumorpatienten CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen

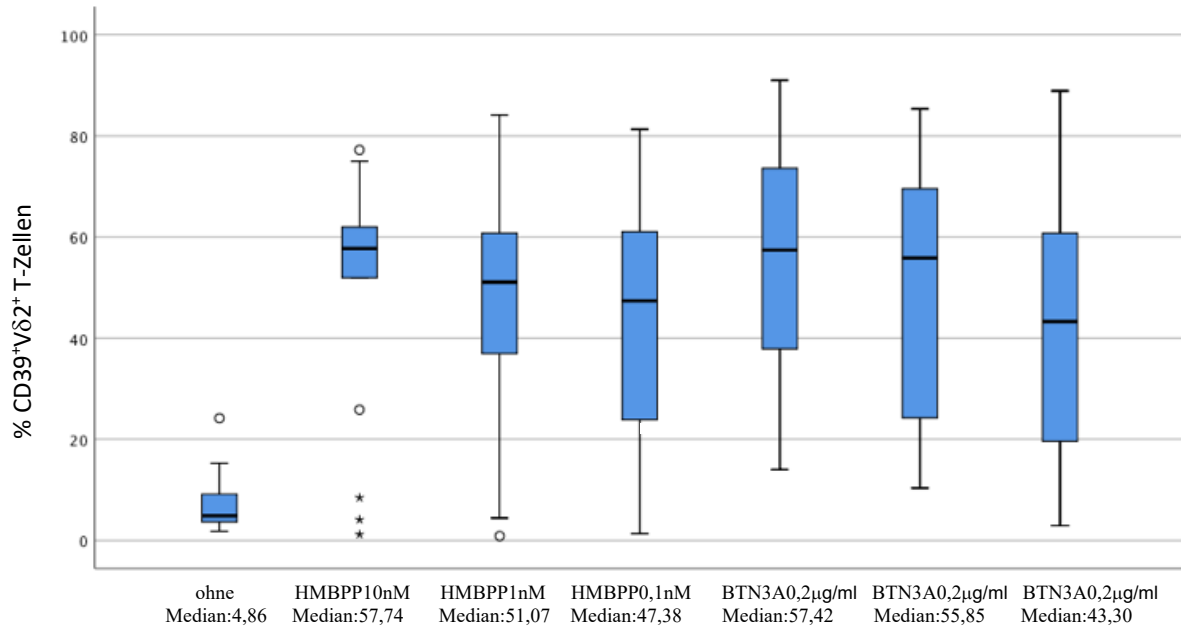


Abbildung 34: Prozentuale Darstellung der CD39 Expression auf den Vδ2⁺ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 8 für die Normalspender (A) und die Tumorpatienten (B) an Tag 8. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{igste} und 75^{igste} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extreme Ausreißer; Kreis: leichte Ausreißer.

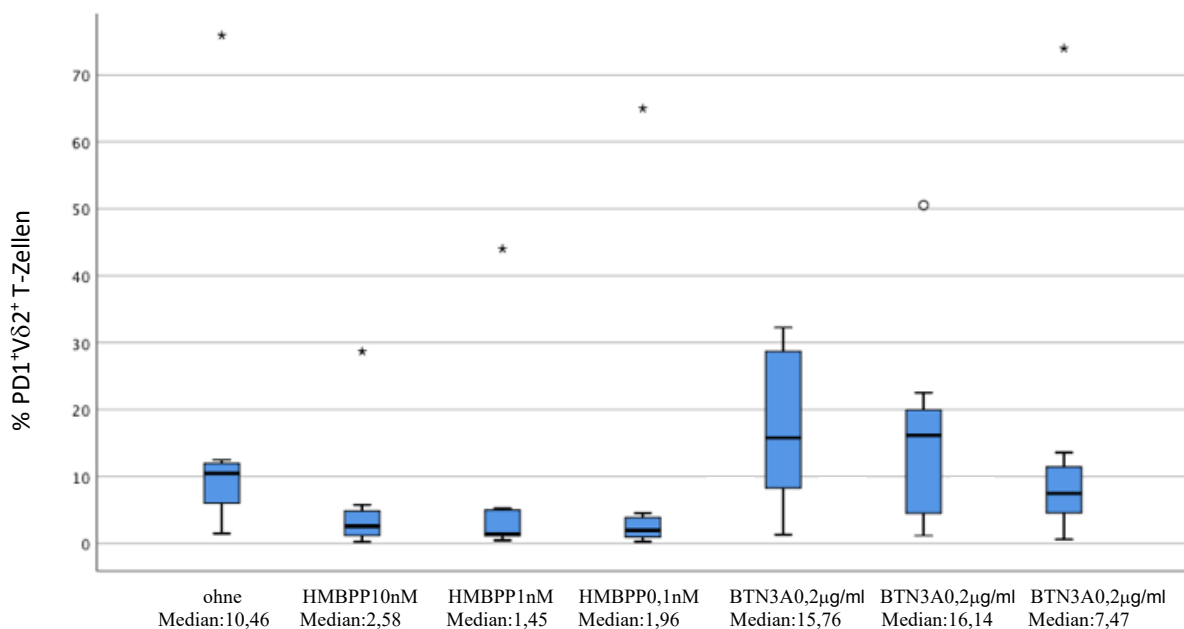
Bei der PD1 Expression ließen sich bei den Normalspendern und den Tumorpatienten unterschiedliche signifikante Ergebnisse ermittelt. Für die Normalspender ergaben sich bei dem angewendeten Wilcoxon-Test drei Signifikanzen, jeweils bei HMBPP 10nM, HMBPP 1nM und HMBPP 0,1nM. Hier ergaben sich signifikant höhere PD1⁺ Vδ2 T-Zellen für die Negativkontrolle. Bei den Tumorpatienten ergaben sich für HMBPP 10nM, für BTN3A 0,2 µg/ml, BTN3A 0,02 µg/ml signifikant höhere bzw. für BTN3A 0,002 µg/ml schwach signifikant höhere Werte der PD1 Expression für die besagten Stimulanzen. Bei HMBPP 1nM und HMBPP 0,1nM lag bei der Tumorkohorte eine signifikant höhere PD1 Expression bei der Negativkontrolle im Vergleich vor. Die ermittelten P-Werte können der nachstehenden Tabelle entnommen werden und auch hier wieder mit Hilfe der Tabelle der Ränge gedeutet werden (Tab. 29 und 46).

Tabelle 29: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der PD1⁺ Vd2⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 8 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz. Die blau markierten Werte heben die signifikanten P-Werte (Wilcoxon Test, p<0,05) hervor. Deutung mittels Tabelle 46 im Anhang.

Statistik für Test

	Gruppe			
	Normalspender		Patienten	
	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 10nM – d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	-2.366 ^b	0.018	-2.330 ^b	0.020
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 1nM – d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	-2.366 ^b	0.018	-3.506 ^b	0.000
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 0,1nM – d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	-2.028 ^b	0.043	-3.245 ^b	0.001
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml – d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	-0,507 ^c	0.612	-3.375 ^c	0.001
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml – d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	-0.338 ^c	0.735	-2.591 ^c	0.010
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml – d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	-0.338 ^b	0.735	-1.851 ^c	0.064

A: Normalspender PD1⁺ Vd2⁺ T-Zellen



B: Tumorpatienten PD1⁺ Vδ2⁺ T-Zellen

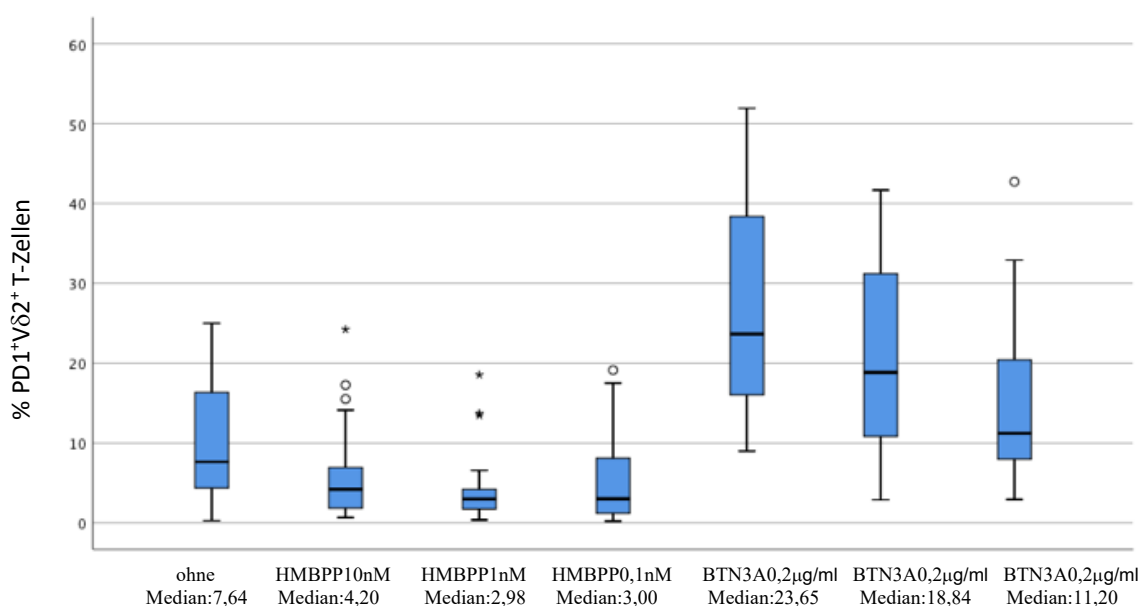


Abbildung 35: Prozentuale Darstellung der PD1 Expression auf den Vδ2⁺ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 8 für die Normalspender (A) und die Tumorpatienten (B). Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extreme Ausreißer; Kreis: leichte Ausreißer.

Bislang wurden für Tag 1 und Tag 8 die Expression der Oberflächenmoleküle auf Vδ2⁺ T-Zellen und deren veränderte Expression mit Stimulanzen und ohne Stimulanzen für die jeweiligen Kohorten getrennt betrachtet und es ergaben sich die oben aufgezeigten Ergebnisse und Signifikanzen. Es stellte sich jedoch auch die Frage, ob es zwischen den beiden Kohorten untereinander Unterschiede bei der Expression gab. Hierfür wurden die Variablen mittels des Mann-Whitney-U-Tests untersucht.

Die ermittelten signifikanten Unterschiede können den nachstehenden Tabellen 30 entnommen werden. An Tag 1 wiesen die Tumorpatienten für die CD161⁺ Vδ2 T-Zellen im Vergleich zu den Normal Spendern bei HMBPP 10nM, BTN3A 0,2µg/ml sowie bei der Negativkontrolle signifikant höhere Werte auf. Zudem wiesen die Tumorpatienten bei sc20.1 2µg/ml einen schwach signifikant höheren CD161 Expression auf Vδ2 T-Zellen auf. Alle weiteren Vergleiche unter den beiden Kohorten ergaben keine signifikanten Unterschiede. Zur genauen Interpretation kann die Tabelle 47 (siehe Anhang) hinzugezogen werden.

Tabelle 30: Signifikanzberechnung. Darstellung der errechneten P-Werte (asymptotische Signifikanz) mittels Mann-Whitney-U-Test. Vergleich der Normalspender und der Tumorpatienten hinsichtlich der CD161, CD39 und PD1 Oberflächenexpression an Tag 1 mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz. Blau markierte Werte sind signifikante P-Werte (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Deutung mittels Tabelle 47 im Anhang.

	Mann-Whitney-U	Wilcoxon-W	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	22.500	50.500	-2.452	0.014
d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 10nM	26.000	54.000	-2.239	0.025
d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	27.000	55.000	-2.179	0.029
d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml	30.000	58.000	-1.874	0.061
d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	49.000	220.000	-0.847	0.397
d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 10nM	55.000	226.000	-0.484	0.628
d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	61.000	89.000	-0.121	0.904
d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml	47.000	200.000	-0.794	0.427
d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	53.500	81.500	-0.576	0.565
d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 10nM	41.000	212.000	-1.332	0.183
d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	61.000	89.000	-0.121	0.904
d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml	52.000	205.000	-0.477	0.634

In den nachstehenden Boxplots werden die ermittelten signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten für die Messung an Tag 1 graphisch verdeutlicht.

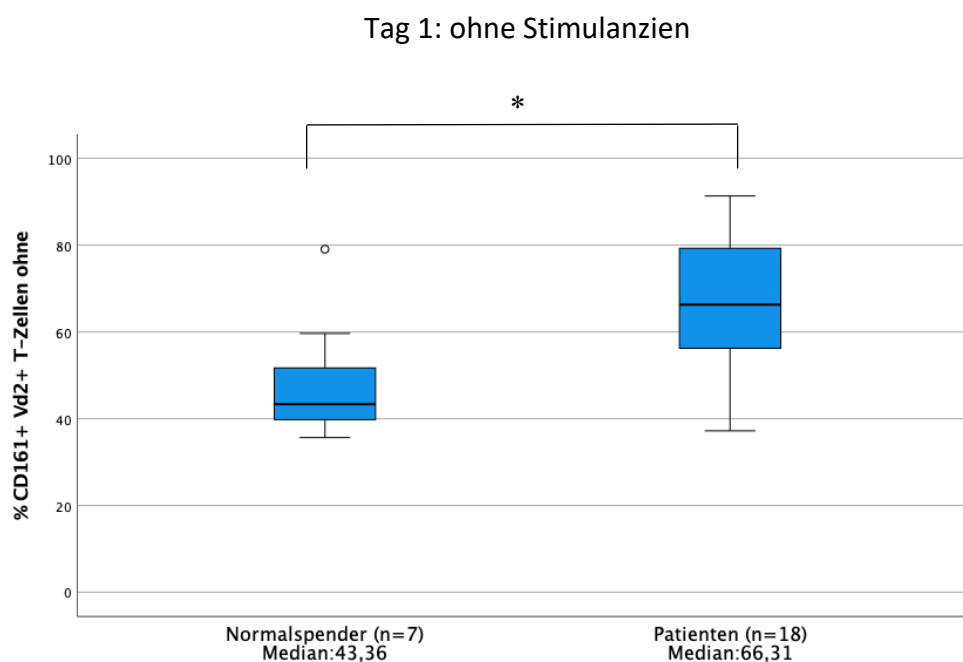


Abbildung 36: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen (Negativkontrolle). *: $p = 0,014$ (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Kreis: leichter Ausreißer

Tag 1: HMBPP 10nM

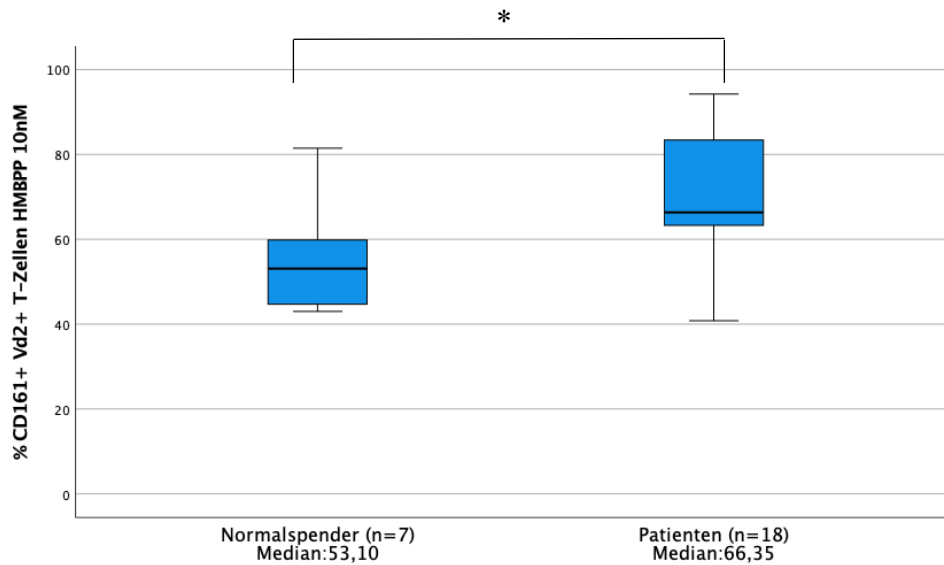


Abbildung 37: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten unter Verwendung von HMBPP 10nM als Stimulanz. *: p=0,025 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker.

Tag 1: BTN3A 0,2 µg/ml

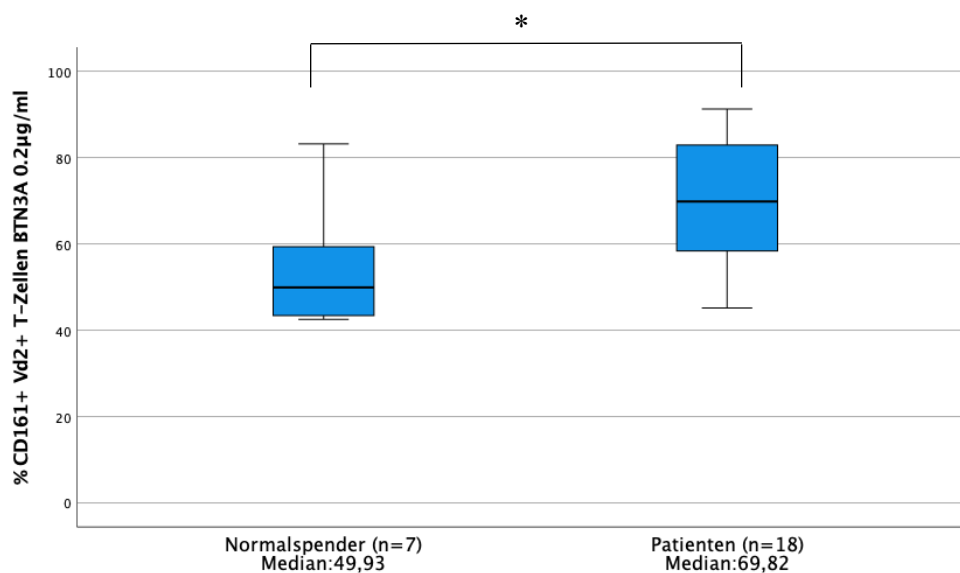


Abbildung 38: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten unter Verwendung von BTN3A 0,2 als Stimulanz. *: p=0,029 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker.

Tag 1: sc20.1 2µg/ml

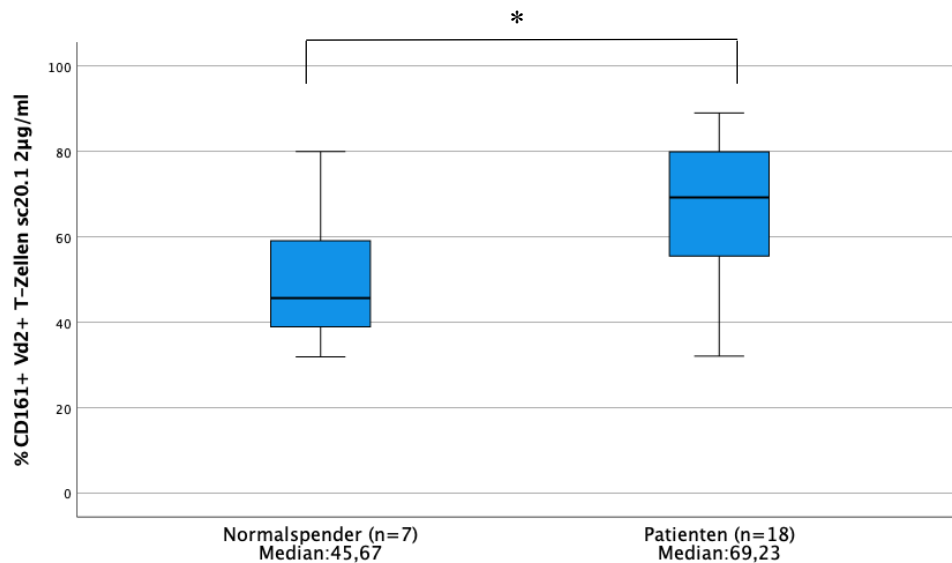


Abbildung 39: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten unter Verwendung von sc20.1 2 als Stimulanz. *: p=0,061 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen schwach signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{te} und 75^{te} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Kreis: leichter Ausreißer

An Tag 8 wiesen die Tumorpatienten für die CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei HMBPP 10nM und 1nM sowie bei BTN3A 0,2µg/ml signifikant höhere Werte im Vergleich zu den Normal Spendern auf. Zudem wiesen die Tumorpatienten bei der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen Negativkontrolle schwach signifikant höhere Werte auf. Ein weiterer schwach signifikanter Unterschied ergab sich bei der Negativkontrolle der CD39⁺ Oberflächenmolekülexpression, hier sind die Werte der Normalspender schwach signifikant höher. Alle weiteren Vergleiche unter den beiden Kohorten ergaben keine signifikanten Unterschiede. Zur genauen Interpretation können die nachstehenden Tabellen 31 hinzugezogen werden und anhand der Tabelle der Ränge (Tab. 48) auf die Richtung der Signifikanz gedeutet werden.

Tabelle 31: Signifikanzberechnung. Darstellung der errechneten P-Werte (asymptotische Signifikanz) mittels Mann-Whitney-U-Test. Vergleich der Normalspender und der Tumorpatienten hinsichtlich ihrer CD161, CD39 und PD1 Oberflächenexpression an Tag 8 mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz. Blau markierte Werte sind signifikante P-Werte (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). Deutung mittels Tabelle 48 im Anhang.

	Mann-Whitney-U	Wilcoxon-W	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	34.000	62.000	-1.755	0.079
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 10nM	22.000	50.000	-2.481	0.013
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 1nM	29.000	57.000	-2.059	0.040
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 0,1nM	40.000	68.000	-1.392	0.164
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	18.000	46.000	-2.724	0.006
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml	41.000	69.000	-1.332	0.183
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml	37.000	65.000	-1.574	0.116
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	33.000	204.000	-1.816	0.069
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 10nM	62.000	233.000	-0.061	0.952
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 1nM	62.000	233.000	-0.061	0.952
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 0,1nM	57.000	228.000	-0.363	0.717
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	53.000	81.000	-0.605	0.545
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml	56.000	227.000	-0.424	0.672
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml	63.000	234.000	0.000	1.000
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	62.000	233.000	-0.061	0.952
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 10nM	50.000	78.000	-0.787	0.431
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 1nM	59.000	87.000	-0.242	0.809
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 0,1nM	52.000	80.000	-0.666	0.505
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	39.000	67.000	-1.453	0.146
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml	46.000	74.000	-1.029	0.304
d8 PD1 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml	42.000	70.000	-1,271	0.204

In den nachstehenden Boxplots werden die ermittelten signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten für die Messung an Tag 8 graphisch verdeutlicht.

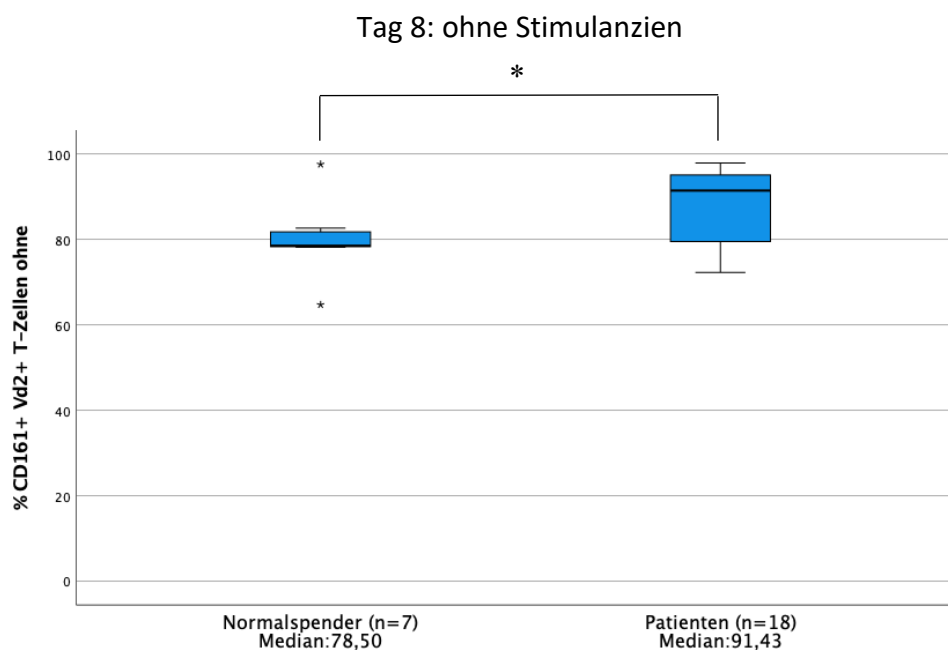


Abbildung 40: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vd2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen (Negativkontrolle) an Tag 8. *: $p = 0,079$ (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$): die Tumorpatienten wiesen schwach signifikant höhere CD161⁺ Vd2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer.

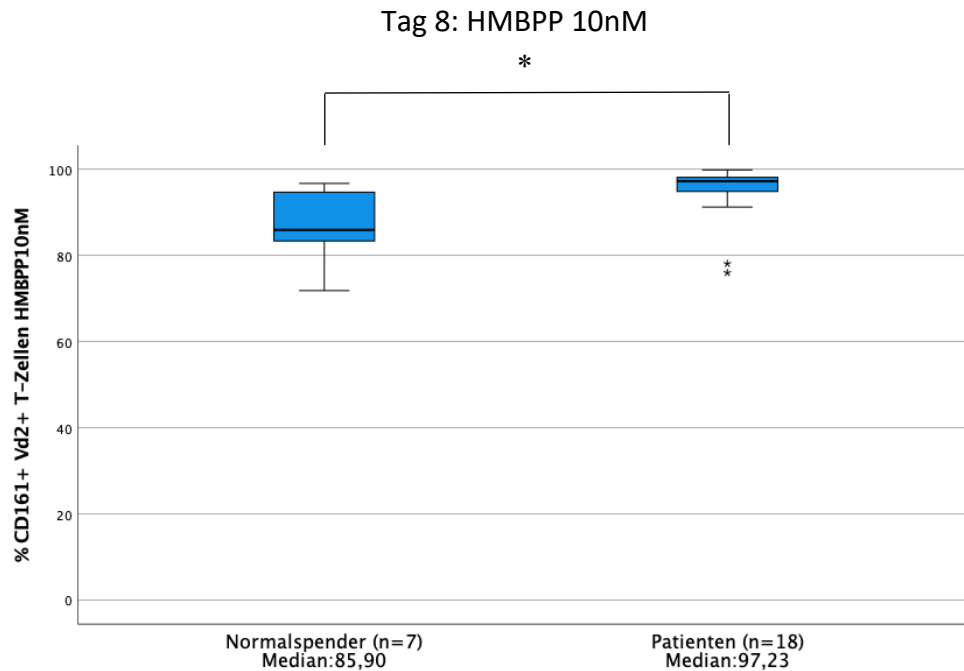


Abbildung 41: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten nach Anwendung von HMBPP 10nM als Stimulanz an Tag 8. *: p=0,013 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{igste} und 75^{igste} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

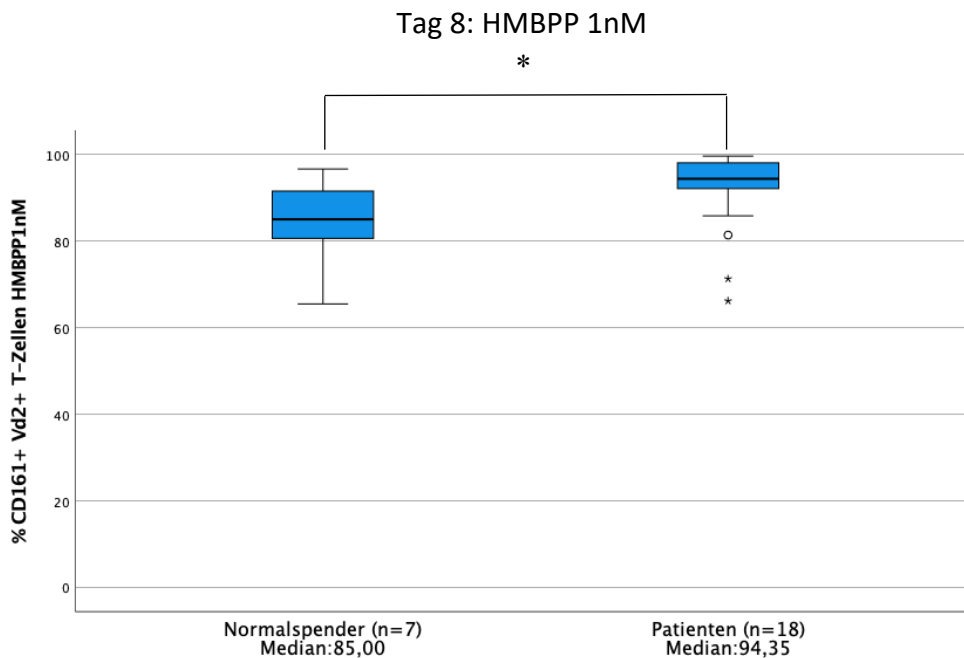


Abbildung 42: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten nach Anwendung von HMBPP 1nM als Stimulanz an Tag 8. *: p=0,040 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25^{igste} und 75^{igste} Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer; Kreis: leichter Ausreißer.

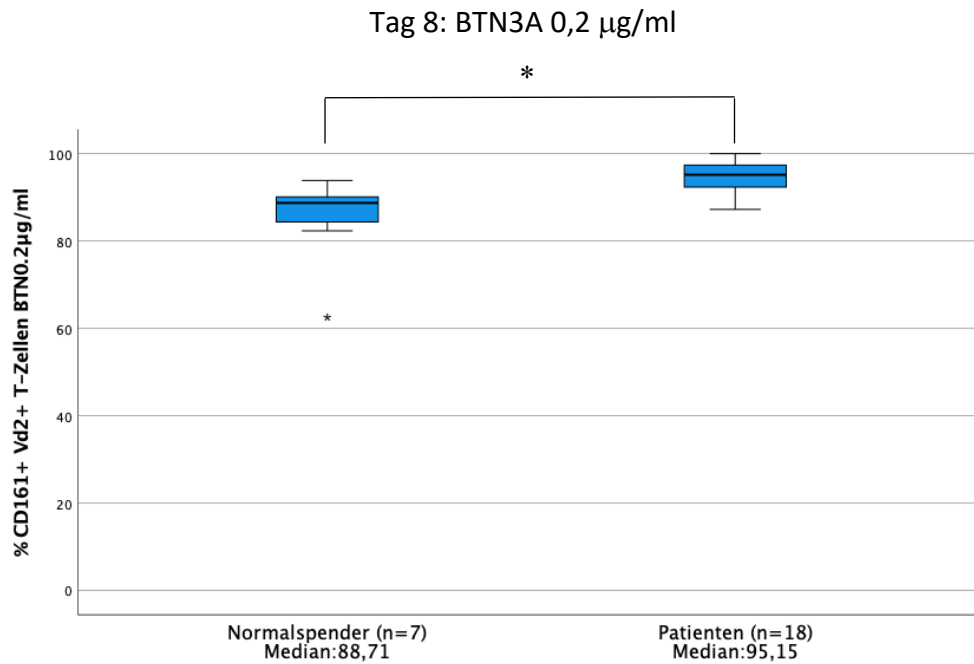


Abbildung 43: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten nach Anwendung von BTN3A 0,2 µg/ml als Stimulanz an Tag 8. *: p=0,006 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Tumorpatienten wiesen signifikant höhere CD161⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Normalspender. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Stern: extremer Ausreißer.

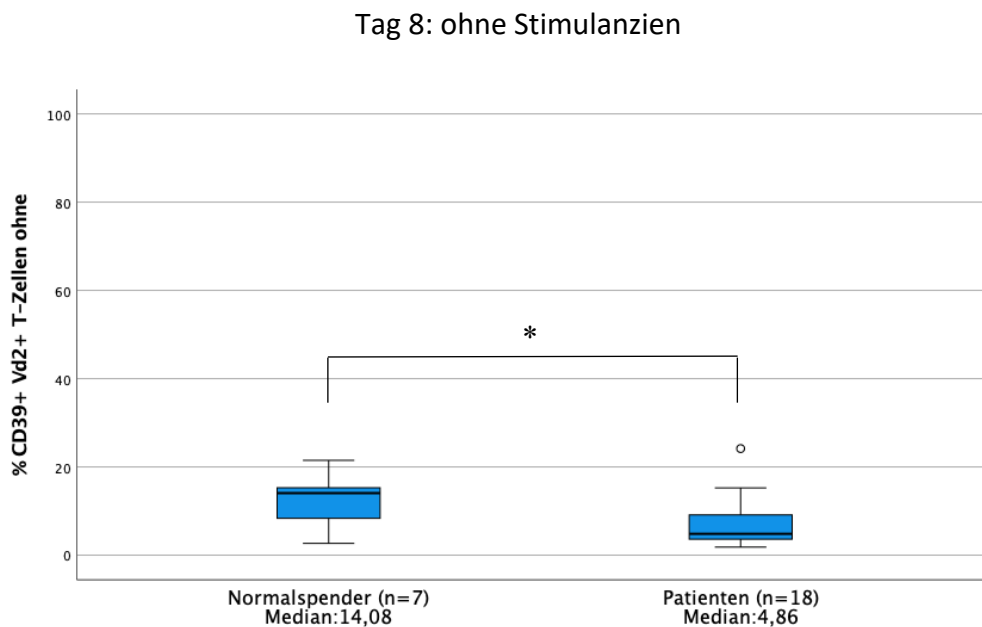


Abbildung 44: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen (Negativkontrolle) an Tag 8.. *: p=0,069 (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05): die Normalspender wiesen schwach signifikant höhere CD39⁺ Vδ2⁺ T-Zellen auf als die Tumorpatienten. Der Median wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile begrenzt die Box, Minimum und Maximum als unterer und oberer Whisker. Kreis: leichter Ausreißer.

4. Diskussion

Einen interessanten und besonderen Ansatz stellen Immuntherapiemöglichkeiten mit $\gamma\delta$ T-Lymphozyten dar. Das Ziel und die Strategie einer möglichen Therapie von malignen Erkrankungen mit $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen beruht einerseits auf der Möglichkeit einer in vivo Stimulation der Zellen und andererseits auf der Möglichkeit einer in vitro Proliferation der Zellen mit nachfolgender Zelltransfusion an den erkrankten Patienten. Für eine bestmögliche Anwendung einer Immuntherapie mit $\gamma\delta$ T-Zellen muss jedoch der Mechanismus der Aktivierung und der Proliferation vorerst besser verstanden werden und mögliche vorab bestehende und die Therapie möglicherweise beeinflussenden Unterschiede zwischen Gesunden und an Tumoren erkrankten Patienten charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter anderem auch versucht werden, mögliche Ursachen und Rückschlüsse zu detektieren, die eine unterschiedliche Therapieansprechbarkeit nachsichtragen könnten. Es sollte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht wie beispielsweise bei Yang et al. und anderen Gruppen z.B. Gu et al. der Wirkmechanismus auf molekularer Ebene dargestellt und genauer untersucht werden (66,86), sondern mittels der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle. Anhand der Expression von CD69 sollte die Aktivierungsfähigkeit von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen mittels HMBPP, BTN3A Antikörper und sc20.1 als Stimulanzen untersucht und detektiert werden und dadurch neue Erkenntnisse bezüglich der Aktivierungsfähigkeit getroffen werden. CD69 ist ein membrangebundener Typ-II C-Lectin Rezeptor, der als früh exprimierter Marker besonders für die Aktivierung von Lymphozyten fungiert. Die CD69-Expression wird auf der Oberfläche der T-Lymphozyten nach Stimulation über den TCR rasch induziert. Die Expression des CD69 Proteins kann bereits nach 2-3 Stunden nach Stimulation nachgewiesen werden (87,88). Diese Eigenschaft wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt. Um also die Frage des Aktivierungsmechanismus besser zu verstehen, wurden die $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen einerseits mit dem hoch aktiven pAg HMBPP aktiviert, demnach auf einer B30.2 Domänen abhängigen Weise und andererseits mittels des monoklonalen BTN3A Antikörpers 20.1 (mAb20.1) und eines von ihm abgeleiteten single chain Konstrukts (sc 20.1), in einer B30.2 Domänen

unabhängigen Weise (57,59). Auch in Hinblick auf die Proliferationsfähigkeit der V γ 9V δ 2 T-Zellen war es Bestandteil der vorliegenden Dissertation zu untersuchen, ob eine selektive Proliferation mittels HMBPP und BTN-Antikörper möglich ist und ob es bei der Proliferationsfähigkeit unter Verwendung der Stimuli Unterschiede zwischen der Tumorkohorte und den gesunden Spendern gibt. Mit Hilfe aller drei verwendeten Stimulanzen konnte eine Aktivierung aufgezeigt werden. Demnach unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Aussagen von beispielsweise Yang et al. bezüglich der HMBPP Aktivierungsfähigkeit (86) und der Fähigkeit V γ 9V δ 2 T-Zellen mittels BTN-Antikörpern zu aktivieren (25). Auch ihre Fähigkeit zur selektiven Proliferation und Stimulation wurde in den Experimenten dieser Dissertation bestätigt. Die Aktivierung fiel jedoch unterschiedlich stark aus, wobei bei HMBPP eine deutlich höhere Aktivierungsfähigkeit ermittelt werden konnte als bei den Antikörpern, bei denselben Testpersonen. Dies deutet auf die bereits durch Palakodeti et al. beschriebenen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen hin (25). Die Ergebnisse dieser Dissertation stimmen mit Untersuchungen von Kunzmann et al. überein. Kunzmann et al. zeigten in ihrer Pilotstudie zum ersten Mal, dass die Verabreichung von pAg eine selektive Aktivierung und Proliferation von V γ 9V δ 2 T-Zellen in vivo induziert (89). Diese selektive Aktivierung und Proliferation konnte auch in der vorliegenden Arbeit bekräftigt werden, hier fand dies jedoch im Unterschied dazu ex vivo statt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die Verwendung des potenten Phosphoantigens HMBPP als auch die Verwendung der BTN-Antikörper zu einer Aktivierung und demnach zu einer CD69-Expression führte. Auch mittels der errechneten Stimulationsindizes für jede verwendete Stimulanz konnte dieses Ergebnis verdeutlicht und bekräftigt werden. Hier wurde ein Cut Off Wert von 5,0 für die errechneten Stimulationsindizes gewählt, anhand dessen eine Aussage bezüglich der Aktivierungsfähigkeit getroffen werden sollte. Dabei konnte für die Stimulanzen HMBPP 10nM und BTN3A 0,2 μ g/ml bei den Normal Spendern eine 100%ige Aktivierungsfähigkeit anhand der SI-Werte ermittelt werden. Bei dem Stimulanz sc20.1 2 μ g/ml konnte eine 71,43%ige Aktivierungsfähigkeit ermittelt werden. Dies kann der Tabelle 9 (Kap. 3.2) entnommen werden. Somit konnte die Ausgangsfrage der Aktivierungsfähigkeit in einer pAg-abhängigen und einer BTN3A-

abhängigen Weise beantwortet werden. Es wurde nicht nur hinsichtlich einer Aktivierungsfähigkeit generell getestet, sondern sollte im Weiteren auch untersucht werden, ob ein Unterschied bei der Aktivierungsfähigkeit zwischen Tumorpatienten und Normalspendern besteht. Hierzu wurden zwei Kohorten miteinander verglichen. Ausgangsfrage war zu klären, ob es eine verminderte Reaktivität auf pAgs bei Tumorpatienten gibt. Erwartungsgemäß konnte eine verminderte Aktivierungsfähigkeit durch HMBPP bei Tumorpatienten im Gegensatz zu Gesunden in dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wie die Gruppe von Kunzmann et al. (90,91). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten einen signifikanten Unterschied bei der Aktivierungsfähigkeit hinsichtlich HMBPP für die Normalspender ($p=0,04$). Demnach findet die Aktivierung mittels HMBPP signifikant besser bei den Normalspendern statt. Bezüglich der Aktivierung mittels der BTN-Antikörper konnte dahingehend jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten aufgezeigt werden. Es zeigte sich jedoch hier, bezogen auf die Mittelwerte der jeweiligen Kohorten, auch bei den Antikörpern eine bessere Aktivierungsfähigkeit bei den Normalspendern. Dies sollte im Rahmen weiterer Experimente mit größeren Kohorten erneut untersucht werden. In Hinblick auf die Proliferationsfähigkeit der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wurden PBMCs mittels HMBPP (10nM, 1nM, 0,1nM) und dem agonistischen BTN3A-Antikörper (mab20.1) (0,2ug/ml, 0,02ug/ml, 0,002ug/ml) unter Zugabe von IL-2 für 8 Tage stimuliert und anschließend die Proliferationsfähigkeit durchflusszytometrisch bestimmt. Mittels der unterschiedlichen Konzentrationen konnte so ein Rückschluss gezogen werden, ob und mit welcher Konzentration eine starke Proliferation möglich ist. Es ergaben sich für alle Konzentrationen und für beide Stimulanzen eine signifikant höhere $V\delta 2$ T-Zellanzahl im Vergleich zu der gemessenen T-Zellmenge an Tag 0. Das bedeutet, dass mittels beider Stimulanzen die Frage nach der Proliferationsfähigkeit der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen unter deren Verwendung mit ja beantwortet werden kann. Unter Verwendung von HMBPP in allen drei Konzentrationsstufen ergaben sich jedoch, absteigend von der Konzentration, höhere Mittelwerte der proliferierten $V\delta 2$ T-Zelle als unter Verwendung des BTN-Antikörpers. Ursachen hierfür könnte zum einen die sehr starke potente Eigenschaft von

HMBPP als Stimulanz sein (92). Es könnten des Weiteren auch externe Faktoren und Cofaktoren eine Rolle spielen. Es konnten auch hier interindividuelle Unterschiede innerhalb der Kohorten vermerkt werden, was Bestandteil weiterer Untersuchungen sein sollte. Im Weiteren wurde untersucht, ob ein Unterschied zwischen beiden Kohorten hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit ersichtlich wird. Auch hier konnte in der vorliegenden Dissertation erwartungsgemäß ein Unterschied festgestellt werden. Bei den Tumorpatienten ergaben sich sowohl unter der Verwendung von HMBPP als auch des BTN-Antikörpers niedrigere Proliferationsfähigkeiten als bei den Normalspendern. Es konnte jedoch nur bei der Konzentration 0,1nM HMBPP ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p=0,04$). Nichtsdestotrotz zeigte sich beim Vergleich der Mittelwerte eine bessere Proliferationsfähigkeit der Normalspender. Dies wird auch anhand der ermittelten Stimulationsindexe ersichtlich und untermauert. Hierbei wurde für die Proliferationsfähigkeit ein Cut Off Wert von 5,0 gewählt und anhand dessen die prozentuale Proliferationsfähigkeit der einzelnen Kohorten unter Verwendung der Stimulanzen, für jedes Stimulanz, ermittelt (Kap. 3.3, Tab. 13). Es zeigte sich auch hier deutlich, dass die Normalspender viel besser proliferieren als die Tumorpatienten. Bei den Normalspendern ließen sich mit Ausnahme von BTN3A 0,002 $\mu\text{g/ml}$ 100% der $\gamma\delta$ T-Zellen proliferieren, während bei den Tumorpatienten eine maximale Proliferationsfähigkeit von nur 77,78% erreicht werden konnte (Kap. 3.3, Tab. 13).

Ein möglicher zu diskutierender Grund für die verminderte Reaktivität auf die pAgs-Stimulation in der Tumorpatientenkohorte könnte durch eine bereits stattgefunden (permanente) in vivo Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten bedingt durch die Tumorerkrankung erklärt werden. Diese könnte demnach zu einer möglichen Erschöpfung der $\gamma\delta$ T-Zellen führen (46,93,94). Für diese Vermutung würde auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelte signifikant höhere CD69-Expression auf den $\gamma\delta$ T-Zellen der Tumorpatienten im Gegensatz zu den Normalspendern bei der Negativkontrolle (ohne Stimulation) sprechen. Hier zeigte sich demnach, dass die Zellen ohne Zugabe von HMPBB bei den Tumorpatienten bereits signifikant höher voraktiviert waren ($p=0,01$). Die geschilderten Ursachen für eine verminderte Reaktivität der $\gamma\delta$ T-

Zellen in der Tumorkohorte auf HMBPP könnte auch auf die leicht, jedoch nicht signifikante verminderte Reaktivität unter Verwendung der BTN3A-Antikörper zurückzuführen sein. Interessanterweise jedoch stellten sich interindividuelle Unterschiede dar. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde aufgezeigt, dass Spender, bei denen eine Aktivierung mittels HMBPP beispielsweise nur sehr schwach ausfiel, trotz dessen eine höhere CD69-Expression und somit eine stärkere Aktivierung mittels BTN3A-Antikörper erzeugt werden konnte. Diese Erkenntnisse könnten auch in der vorliegenden Arbeit auf bestehende unterschiedliche Aktivierungsmechanismen hinweisen und bekräftigt die Annahme von Palakodeti et al., dass pAgs und BTN-Antikörper in ähnlicher Weise, jedoch nicht in identischer Weise eine Aktivierung auslösen. Ein Grund für diese interindividuellen Unterschiede könnten die unterschiedlichen Bindungsstellen der pAgs und BTN-Antikörper sein. pAgs binden, mittlerweile durch einige Studien und Arbeitsgruppen belegt (63), an die intrazelluläre Domäne des BTN3A1-Moleküls, BTN-Antikörper binden an die extrazelluläre Domäne. Aus bislang nicht ermittelten Gründen könnte also die durch die Bindung entstehende Konformationsänderung der extrazellulären Domäne unterschiedlich stark detektiert werden. Diese Beobachtungen sollten weitere Untersuchungen nachsichtragen und könnten neue Hinweise auf den Aktivierungsmechanismus der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen geben. Ein weiterer Grund könnte die Spezifität der Bindungseigenschaft von pAgs und der BTN-Antikörper sein. Interessanterweise ist für den Mechanismus der Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch die agonistische Anti-BTN3-Antikörper weder das Vorhandensein von pAgs noch die Expression einer intrazellulären B30.2-Domäne notwendig. Demzufolge waren alle drei BTN3-Isoformen, mit B30.2-Domäne oder ohne, in der Lage, nach Bindung des Agonisten Anti-BTN3 20.1 mAbs eine Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen auszulösen (57,59). Demnach wirken die BTN-Antikörper unspezifischer als die pAgs und könnten dadurch womöglich zu den interindividuellen Unterschieden beitragen, indem sie möglicherweise zusätzliche Costimmulierungen auslösen könnten. Auch die Art der dadurch erzeugten Konformationsänderungen nach Bindung der pAgs bzw. der BTN-Antikörper, könnte eine Rolle spielen. Bei pAgs Bindung kommt es zu einer Inside-Out Konformationsänderung mit Einbezug der JMX (66), bei der BTN-Antikörper Bindung an

die extrazelluläre Domäne womöglich zu einer ähnlichen, jedoch nicht identischen, Konformationsänderungen und somit möglicherweise zu unterschiedlichen Erkennung dieser durch die $\gamma\delta$ T-Zellen. Eine weitere Möglichkeit könnte die Mitbeteiligung von Cofaktoren sein, die eine Rolle bei der Aktivierung der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen spielen könnten, wie bereits von einigen Arbeitsgruppen zum Beispiel Gu et al. vorgeschlagen (66). Möglicherweise werden durch die unterschiedlichen Stimuli unterschiedliche Cofaktoren aktiviert und lösen so eine unterschiedliche starke CD69-Expression aus. Diese Cofaktoren könnten durch das Mikromilieu bestimmter Tumorarten oder durch andere Außenfaktoren beeinflusst werden und daher zu unterschiedlichen interindividuellen Ausprägungen der Aktivierungsfähigkeit führen. Die aufgeführten Überlegungen sollten Grundlagen weiterer Studien sein. Zusammenfassend konnten, bezüglich der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellaktivierung und- proliferation, im Rahmen der vorliegenden Arbeit somit Unterschiede zwischen den Tumorpatienten und den Normal Spendern ermittelt werden und interessante interindividuelle Unterschiede bezüglich der verwendeten Stimulanzen aufgezeigt werden.

Eine weitere zu untersuchende Überlegung war das Vorhandensein unterschiedlicher Verteilungen exprimierter Oberflächenmoleküle, welche die Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit beeinflussen und einen Unterschied zwischen den Kohorten begründen könnten. Da $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen sowohl zur Auslösung sofortiger Effektorfunktionen (Zytokinproduktion und zytotoxische Aktivität), als auch zur Gedächtnisbildung und schneller Reaktion nach beispielsweise mikrobieller Reinfektion fähig sind (39,95,96), deutet dies auf die Existenz verschiedener funktioneller Untergruppen der humanen $\gamma\delta$ T-Zellen hin (76). Wie von Dieli et al. 2003 beschrieben, können humane $V\gamma 9V\delta 2$ T-Lymphozyten anhand der Expression von CD45RA- und CD27- Oberflächenmoleküle in vier Untergruppen unterteilt werden. Diese Subgruppen weisen je nach Oberflächenexpression unterschiedliche Fähigkeiten hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit sowie der Auslösung bestimmter Effektorfunktionen auf (76). Die vier Subgruppen wurden von Dieli et al. in naive ($CD45RA^+CD27^-$), in Central Memory (CM) ($CD45RA^-CD27^+$), Effector Memory (EM) ($CD45RA^-CD27^-$), sowie terminal

differenzierte TEMRA (CD45RA⁺CD27⁻) unterteilt. In der vorliegenden Arbeit wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen, sowohl aus der Kohorte der Normalspender als auch der Tumorpatienten, auf ihre Subgruppen mittels Expressionen der CD45RA- und CD27-Oberflächenmoleküle hin untersucht. Es konnte hierbei ein Unterschied in der Verteilung der einzelnen Subgruppen zwischen den untersuchten Kohorten festgestellt werden. Die Normalspender exprimierten eine signifikant höhere Anzahl an naiven T-Zellen ($p=0,05$) im Vergleich zu den Tumorpatienten. Des Weiteren wurden bei den Normalspendern eine höhere Anzahl an Central Memory T-Zellen gemessen. Diese waren jedoch nicht signifikant höher, was auf die Gesamtzahl der getesteten Normalspender zurückzuführen sein könnte ($n=7$). Die gemessenen Werte lagen jedoch bei den Normalspendern für die CM T-Zellen bei einem Mittelwert von 34.42 (SD 22.86) und bei den Tumorpatienten bei einem Mittelwert von 21.04 (SD 15.65). Die CM T-Zellanzahl war demnach bei den Tumorpatienten niedriger als bei den Normalspendern. Für die Effector Memory T-Zellen ergab sich eine signifikant höhere Anzahl an dieser Zellsubgruppe bei den Tumorpatienten ($p=0,00$). Bei den TEMRA T-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung ermittelt werden. Auch hier könnte dies auf die Gesamtzahl der getesteten Spender zurückzuführen sein. Anhand dieser Ergebnisse konnte in der vorliegenden Arbeit bei den Tumorpatienten eine Verschiebung der Subgruppen in Richtung differenzierter $\gamma\delta$ T-Zellen (EM T-Zellen) festgestellt werden. Bei den Normalspendern eine Verschiebung in Richtung nicht differenzierter $\gamma\delta$ T-Zellen (naive und CM T-Zellen). Diese ermittelten Werte stimmen mit denen von Dieli et al. überein, da auch in Untersuchungen seiner Arbeitsgruppe die Kohorte der gesunden Spender in der Subgruppe der CM T-Zellen die höchste Anzahl aufwies. Basierend auf der Expression von CD27 haben Gioia et al. den CD27⁺ T-Zellen eine hohe Proliferationsfähigkeit jedoch eine geringe INF γ Produktion zugesprochen, den CD27⁻ T-Zellen sprachen sie ein reziprokes Verhalten bezüglich der Proliferationsfähigkeit und der INF γ Produktion zu (97). Demnach sind naive sowie Central Memory T-Zellen (beide CD27⁺) in der Lage, besser zu proliferieren als die Effector Memory und TEMRA T-Zellen (beide CD27⁻). Diese Rückschlüsse können auch im Rahmen der vorliegenden Dissertation gezogen werden und bekräftigen die Aussage von Gioia et al. bezüglich der

Proliferationsfähigkeit (97). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gesunder Spender nach Stimulation mittels pAgs stärker proliferieren als $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen der Tumorpatienten unter den gleichen Bedingungen. Dieser Unterschied könnte durch die Verschiebung in Richtung differenzierter T-Zellen (EM T-Zellen) bei den Tumorpatienten begründet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden dahingehend auch durch die Ergebnisse von Dieli et al. untermauert. Dieli et al. hatten in ähnlicher Weise, wie in der vorliegenden Arbeit, PBMC mit einem pAg (bei Dieli et al. IPP) sowie mit IL-2 für 12 Tage inkubiert und die Zellproliferation anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Auch Dieli et al. beschrieben einen Unterschied in der Proliferationsfähigkeit der unterschiedlichen Subgruppen. Sie zeigten, dass die nicht differenzierten T-Zellsubgruppen, naive und CM, stärker bzw. sogar signifikant stärker proliferierten. Bei den differenzierten Subgruppen, EM und TEMRA, konnte nur eine schwache bzw. kaum oder gar keine Proliferation nachgewiesen werden (76). Hierbei kam für Dieli et al. die Vermutung auf, dass sich die $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen zumindest bei in-vitro Kultur mit Antigenen durch das folgende Abstammungsmuster differenzieren: naive ($CD45RA^+CD27^-$) \rightarrow Central Memory ($CD45RA^-CD27^+$) \rightarrow Effector Memory ($CD45RA^-CD27^-$) \rightarrow terminal differenzierte TEMRA ($CD45RA^+CD27^-$) (76). Der Schritt des Verschiebungsmusters bis zu den EM T-Zellen konnte auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt und vermutet werden. Dies könnte bedingt durch den Kontakt zu Tumorantigenen im Rahmen der Tumorerkrankung erklärt werden und führt zu der beschriebenen Verschiebung in Richtung differenzierter EM T-Zellen bei den Tumorpatienten. Da die Tumorpatienten in der vorliegenden Arbeit in der Negativkontrolle bezüglich des Aktivierungsmarkers CD69 signifikant höhere Werte aufgewiesen haben, als die Normalspender, könnte dies ein weiteres Indiz dafür sein, dass die Zellen durch die Tumorerkrankung bereits zum Teil voraktiviert waren und daher auch zum einen nur geringer durch die Stimulanzen aktiviert werden konnten, da ihre T-Zellen sich bereits vorab in Richtung differenzierter T-Lymphozyten differenziert haben. Dieli et al. konnten in Rahmen ihrer Experimente aufzeigen, dass in entzündeten Geweben und Flüssigkeiten EM und hauptsächlich TEMRA T-Zellen vertreten sind (76). Dies bekräftigt erneut auch die Verteilung in der vorliegenden Arbeit zusätzlich, da die

Tumorpatienten bereits Kontakt zu Tumorzellen hatten. Anhand dieser Erkenntnis könnten zukünftig Patienten vorab besser detektiert werden und dahingehend untersucht werden, welche der $\gamma\delta$ T-Zell Subgruppe sie besitzen und wie fähig ihre Zellen zur Proliferation und Aktivierung sein könnten.

Trotz der multiplen Effektorfunktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen nach deren Aktivierung und der Stellung als attraktive Kandidaten in Hinblick auf Immuntherapien gegen Malignome, haben bereits durchgeführte klinische Studien über gemischte Patientenreaktionen bezüglich der Eliminierung von Tumorzelllinien nach Aktivierung berichtet. In Hinblick auf diese Heterogenität haben Ryan et al. verschiedene V δ 2-Profile identifiziert, mit denen eine definierte Effektorfunktion eines Individuums vorhergesagt werden soll. Somit sollen auch Rückschlüsse über den Mechanismus und die Effizienz der Eliminierung einer Reihe von Tumorzelllinien vorhergesagt werden können und auch Rückschlüsse auf deren Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit getroffen werden können (77). Ryan et al. identifizierten diese V δ 2 T-Zell Profile an einer großen Kohorte (n=63) gesunder Spender. Sie verwendeten hierfür die Oberflächenmoleküle CD27, CD28 und CD16 und konnten so vier verschiedene Populationen identifizieren: $\gamma\delta$ (28+)-Zellen {CD28(+) $\gamma\delta$ 27(-) $\gamma\delta$ 16(-)}, $\gamma\delta$ (28-)-Zellen {CD28(-) $\gamma\delta$ 27(+) $\gamma\delta$ 16(-)}, $\gamma\delta$ (16-)-Zellen {CD28(-) $\gamma\delta$ 27(-) $\gamma\delta$ 16(-)} und $\gamma\delta$ (16+)-Zellen {CD28(-) $\gamma\delta$ 27(-) $\gamma\delta$ 16(+)}. Anhand dessen konnten im Weiteren durch die relative Verteilung der Untergruppen $\gamma\delta$ (28+), $\gamma\delta$ (28-), $\gamma\delta$ (16+) und $\gamma\delta$ (16-) die insgesamt 6 Profile definiert werden (77). Im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde auch hinsichtlich dieser Oberflächenmoleküle untersucht und in der Kohorte der Normalspender als auch in der der Tumorpatienten eine Einteilung in die sechs Profile vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Ergebnisse von Ryan et al. Sowohl in den Ergebnissen von Ryan et al. als auch in denen der vorliegenden Arbeit konnte in der Kohorte der gesunden Spender das Profil 2 am häufigsten beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit machte dieses Profil 71,4% aus. Um des Weiteren zu untersuchen, wie die unterschiedlichen Profile auf eine Phosphoantigenstimulierung reagieren, haben Ryan et al. PBMC von Spendern mit den Profilen 1 oder 2, sowie mit den Profilen 5 oder 6 isoliert und mit HMBPP/IL-2 stimuliert. Es zeigte sich dabei, dass die Profile 1 und 2 als

Reaktion auf HMBPP/IL-2 im Durchschnitt über 10mal mehr expandieren als die Profile 5 und 6 (77). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich ähnliche Reaktionen auf die HMBPP/IL-2 Stimulierung. Diese äußerten sich dadurch, dass sich die Verteilung der Profile bei den gesunden Spendern auf die Profile 1, 2 und 3 beschränkten. Diese Verteilung und die damit verbundene bessere Proliferationsfähigkeit der Normalspender kann in Zusammenhang gesetzt werden und als eine weitere Erklärung für die stärkere Proliferationsfähigkeit der gesunden Spender im Gegensatz zu den Tumorpatienten fungieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Patientenkohorte eine Verteilung der Profile in Richtung Profile 3, 4, 5. Die verminderte Proliferationsfähigkeit in der Tumorkohorte könnte also auf die, wie auch in Ryan et al., ermittelte verminderte Expansionsfähigkeit dieser Profile zurückzuführen sein (77). Ryan et al. hatten jedoch nicht wie in den vorliegenden Ergebnissen die Verteilung erkrankter Patienten untersucht, die einzelnen Effektorfunktionen und Eigenschaften der Profile können jedoch auf die Kohorte der Tumorpatienten zur Beurteilung übertragen werden, wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt. Die Effektorpotenziale der ermittelten $\gamma\delta$ Profile zeigten dabei kontrastierende Phänotypen auf. Es zeigte sich hierbei ein Profil unter anderem mit einer hohen proliferativen Kapazität (Profil 1). Dem entgegengesetzt ein anderes Profil mit einem geringen Expansionspotenzial jedoch mit einer überwiegend zytotoxischen Effektorfähigkeit (Profil 6) (77).

$\gamma\delta$ T-Zellen stellen also vielversprechende Kandidaten für eine Immuntherapie dar. Das durch unterschiedliche Studien immer besser werdende Verständnis und durch die Detektion neuer interessanter Eigenschaften der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten rückt man einer erfolgreichen $\gamma\delta$ T-Zellbasierten Therapie somit näher. Obwohl die Anti-Tumor-Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen bereits gut etabliert ist, können sie jedoch unter bestimmten Umständen, abhängig vom Tumormikromilieu, das Tumorstadium jedoch auch fördern (98). Ein weiterer möglicher zu diskutierender Grund könnte demnach das Mikromilieu des Tumors sein (99,100), welches durch immunsuppressive Zytokine zu einer möglichen Unterdrückung einer Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch HMBPP führen könnte und die Unterschiede erklären könnte. Je nach Mikromilieu des Gewebes haben T-Zellen die Fähigkeit proinflammatorische Zytokine wie INF-gamma, TNF-alpha und IL-

17 sowie antiinflammatorische Zytokine wie TGF-beta, IL-4 und IL-10 zu produzieren (101–103). Dabei exprimieren T-Lymphozyten verschiedene kostimulierende und regulatorische Oberflächenmoleküle, welche die Zytokinproduktion und somit die Effektorfunktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmen (81,101,104–109). Um mögliche Veränderungen der Oberflächenexpression der sowohl regulatorischen als auch Effektorfunktion auslösenden Oberflächenmoleküle zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expressionseigenschaft von CD39, PD-1 und CD161, unter Anwendung der Stimulanzen zur Auslösung einer Aktivierung sowie einer Proliferation, untersucht. So sollten Aussagen getroffen und Daten gesammelt werden, wie sich die Expression der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle unter den jeweiligen Stimulanzen verhält. Diesen Oberflächenmolekülen werden zum Teil prognostische Informationen jedoch auch immunsuppressive Eigenschaften nachgesagt (81,104). Mit Hilfe dieser Oberflächenmoleküle sollte auch hiermit versucht werden, mögliche weitere bestehende Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Kohorten zu identifizieren und somit langfristig weitere Rückschlüsse bezüglich des Erfolges einer Immuntherapie mit $\gamma\delta$ T-Zellen gegen Malignome getroffen werden können.

Bei dem Oberflächenmolekül CD39 handelt es sich um eine Ekto-ATPase, welche ATP und ADP zu Adenosin und Phosphat hydrolysiert (110,111). CD39 reguliert somit als Ekto-ATPase die Homöostase der Immunreaktionen durch die Hydrolyse von ATP und ADP. CD39 spielt auf Grund dieser Eigenschaften auch eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression durch Bildung des immunsuppressiven Adenosins, indem es somit unter anderem die Anti-Tumor-Antwort einiger Immunzellen hemmt (112). CD39 wird als Oberflächenmarker auf unterschiedlichen Immunzellen exprimiert und gilt auch auf $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen als wichtiger Oberflächenmarker (81). Dabei zeigte sich in Studien, dass CD39+ $\gamma\delta$ T-Zellen eine starke immunsuppressive Funktion ausüben und immunregulatorische Eigenschaften aufweisen (81,112). Hu et al. identifizierten CD39+ $\gamma\delta$ T-Zellen als $\gamma\delta$ -Treg Zellen (112). Guoming et al. fanden in Ihrer Studie heraus, dass ca. 50% der tumorinfiltrierenden $\gamma\delta$ T-Zellen hohe Mengen an CD39-Molekülen exprimieren. Darüber hinaus konnten Guoming et al. die Infiltration von CD39+ $\gamma\delta$ Treg-

Zellen im Tumor mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium und anderen ungünstigen klinisch-pathologischen Merkmalen bei Colorektalenkarzinomen assoziieren (112). Zusätzlich zu dessen Fähigkeit ATP und ADP zu hydrolysieren zeigten Gruenbacher et al. in ihrer Studie, dass CD39 auch in der Lage ist selbst- und erregerassoziierte pAgs, unter anderem IPP und HMBPP, zu dephosphorylieren und damit die Aktivierung der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch pAgs zu schwächen oder gar aussetzen. Nur Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) konnte nicht durch CD39 hydrolysiert werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse rückt CD39 als Immun-Kontrollpunkt-Mediator, der die antitumoralen und entzündungsfördernde Immunantwort stört, in den Vordergrund (113,114). CD39 könnte demnach ein neuartiges Kontrollpunkt-Inhibitor-Ziel darstellen und man könnte demnach künftig überlegen, die CD39 Expression oder die CD39 Wirkung durch Inhibition zu verhindern.

Um heraus zu finden, wie sich die CD39 Expression unter Verwendung der Stimulanzen verhält und somit Aussagen für zukünftige mögliche Hindernisse einer erfolgreichen $\gamma\delta$ T-Zellbasierten Immuntherapie zu treffen, wurde in der vorliegenden Arbeit die CD39 Expression untersucht. Hierbei ergaben sich sowohl für die Normalspender als auch für die Tumorpatienten ($p=0,01$ bzw. $p=0,00$) ein signifikanter Anstieg der CD39 Expression an Tag 8 im Vergleich zu Tag 1. Diese Erkenntnisse stimmen mit denen von Gruenbacher et al. überein. Gruenbacher et al. zeigten in ihrer Studie, dass von Tag 3 beginnend eine CD39 Expression auf $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen stattfindet (78). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gruenbacher et al. konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nach Stimulation mittels der verwendeten Stimulanzen eine CD39 Expression bereits an Tag 1 festgestellt werden. Hier konnte unter HMBPP 10nM bei den Normalspender und den Patienten ein signifikanter Anstieg vermerkt werden, bei BTN3A 0,2 μ g/ml konnte nur bei den Tumorpatienten ein signifikanter Anstieg ermittelt werden. Die Signifikanzen ergaben sich immer unter Verwendung der Stimulanzen. Eine Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Patientenanzahl der Normalspender sein und sollte im Rahmen weiterer Studien untersucht werden. An Tag 8 ergaben sich in der vorliegenden Arbeit für alle verwendeten Stimulanzen und Konzentrationen, sowohl für die Normalspender als auch die Tumorpatienten, signifikant höhere Werte im Vergleich

zur Negativkontrolle. Somit stieg die CD39 Expression unter Verwendung der Stimulanzen signifikant an. Im Weiteren wurde untersucht, ob sich zwischen den Kohorten ein signifikanter Unterschied bei der CD39 Expression ergibt. Es ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass durch Zugabe der unterschiedlichen Stimulanzen im Vergleich zur Negativkontrolle die CD39 Expression auf den $\gamma\delta$ T-Zellen zunimmt. Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von Gruenbacher et al., dass pAgs eine CD39 Expression induzieren können (78). Aufgrund der Funktion von CD39 als Ekto-ATPase, die unter anderem HMBPP abbauen kann (78) und somit die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch beispielsweise HMBPP herabsetzen könnte, sollte diese Funktion von CD39 in Zukunft möglicherweise durch Inhibitoren inhibiert werden. Somit könnte möglicherweise ein besseres Ansprechen einer Therapie mit $\gamma\delta$ T-Zellen gewährleistet werden. Vor allem, da es keine Unterschiede zwischen den Kohorten gab, muss sowohl bei der in vivo Stimulierung als auch bei der in vitro Stimulierung mit anschließendem Transfer dieser Anstieg der CD39 Expression berücksichtigt werden. Gruenbacher et al. konnten in Ihrer Studie zeigen, dass die CD39 Expression auch mittels Antikörper gegen CD277/BTN3A induziert wird. Auch diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bekräftigt werden, da in dieser Arbeit auch unter Verwendung des BTN3A Antikörpers ein signifikanter Anstieg der CD39+ $\gamma\delta$ T-Zellen detektiert werden konnte. Gruenbacher et al. zeigten auch, dass das pathogen-assoziierte HMBPP zwar durch CD39 hydrolysiert wird, jedoch nicht in gleichem Maße wie beispielsweise IPP oder andere aus dem Mevalonatweg stammenden pAgs. Dies könnte auch der Grund für die höhere Wirksamkeit von HMBPP bei der Stimulierung von V γ 9V δ 2 T-Zellen sein (78) und der Grund, wieso trotz CD39 Expression unter HMPBB immer noch eine starke Aktivierung- und Proliferation unter diesem Stimulus in der vorliegenden Arbeit möglich war.

Die in der vorliegenden Arbeit auffallenden interindividuellen Unterschiede könnten möglicherweise auch auf die CD39 Expression zurückzuführen sein, da bei einigen der Patienten HMBPP möglicherweise durch die Ekto-ATPase in größerem Maße abgebaut wurde oder hier die Expression von CD39 unterschiedlich stark ausfiel und somit eine geringere Aktivierung bzw. Proliferation ermöglicht wurde. Die Aktivierung bzw.

Proliferation jedoch unter BTN3A konnte trotz dessen stattfinden, da diese nicht vom Abbau durch CD39 affektiert wird und somit im Gegensatz zu HMBPP bei einigen Patienten stärker ausfiel. Folglich könnte die Behandlung mittels eines CD39-Inhibitors oder mittels blockierender Antikörper eine vielversprechende Strategie für die Verbesserung der $\gamma\delta$ T-Zellvermittelten Immuntherapie darstellen.

Das als programmiertes Zelltod-1 (PD-1) bekannte Membranprotein gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (85). Es stellt ein wichtiges Rezeptorprotein dar, welches von aktivierten T-Zellen unter anderem auch von $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird. Der programmierte Zelltod (PD-1) ist ein inhibitorischer Rezeptor und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell Aktivierung. Nach Bindung der Liganden (PDL-1 und PDL-2) über eine bestimmte molekulare Interaktion (85), führt dies über den PD-1 Rezeptor zu einem inhibitorischen Signal auf die TCR-vermittelte Aktivierung von T-Zellen (85). PD-1 Liganden werden unter anderem von Tumorzellen selbst oder von Zellen des Tumorstroma gebildet. Die Liganden wirken immunsuppressiv, indem sie im Zusammenspiel mit PD-1 die Proliferation und Zytokinfreisetzung in T-Zellen inhibieren. Durch Interaktion mit dem PD-1 Rezeptor auf den T-Zellen werden diese somit deaktiviert. Durch Bildung der Liganden können sich die Tumorzellen somit der Eliminierung durch das Immunsystem entziehen. PD-1 stellt also einen so genannten Checkpoint des Immunsystems dar. Es wurde bereits in Studien berichtet, dass Tumorzellen die PD-L1 exprimieren die spezifische zytotoxische Aktivität von $\alpha\beta$ T-Zellen abschwächen (85,115–118). Über die genaue Rolle bei $\gamma\delta$ T-Zellen ist bislang jedoch erst weniger bekannt. Man vermutet jedoch dieselbe Wirkungsweise, wie bei $\alpha\beta$ T-Zellen. Die Expression von PD-1 kann in primären $\gamma\delta$ T-Zellen nach antigener Stimulation rasch induziert und heraufreguliert werden (85), entweder durch Tumorzellen oder, wie in der vorliegenden Arbeit, durch pAgs bzw. BTN3A Antikörpern. Nach Stimulierung produzieren PD-1⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen IL-2. Wichtig ist zu eruieren, ob sich die Expression von PD-1 unter Verwendung unterschiedlicher Stimulanzen verändert und ob auch hier ein Unterschied zwischen der gesunden Kohorte und der Tumorpatienten Kohorte bestehen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden, frisch isolierte PBMCs mit den unterschiedlichen Stimulanzen in vitro stimuliert und deren PD-1 Expression nach 18-

24h und nach 8 Tagen gemessen. Hier bei zeigte sich bereits an Tag 1 nach Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle sowohl bei den Normalspendern als auch bei den Tumorpatienten ein signifikanter Anstieg der Expression von PD-1. An Tag 8 war die PD-1 Expression für alle Konzentrationen von HMBPP bei den Normalspendern signifikant niedriger unter Verwendung der Stimuli, bei BTN3A Antikörper zeigte sich bei den Normalspendern kein signifikanter Unterschied. Die PD-1 Expression lag bei den Tumorpatienten unter Verwendung aller Stimulanzen und aller Konzentrationen an Tag 8 signifikant höher als bei der Negativkontrolle. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Iwasaki et al. überein (85). Hier konnte unter Verwendung der Stimulanz HMBPP 10mM auch ein signifikanter Anstieg mit einem Maximum an Tag 3 gemessen werden. Die Signifikanzveränderung bei den Normalspendern an Tag 8 ist womöglich auf die kürzere Halbwertszeit von HMBPP in Kultur zurückzuführen. Antikörper weisen längere Halbwertszeiten in Kultur auf. Es konnte somit sowohl durch die Experimente dieser Arbeit als auch durch die von Iwasaki et al. 2011 gezeigt werden, dass es unter Verwendung von HMBPP und BTN3A Antikörper sowie seinem single chain Konstrukt zu einer PD-1 Expression auf $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kommt (85). Da unter Verwendung der Stimulanzen die PD-1 Expression auf den $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ansteigt, sollte dies bei der Therapieplanung beachtet werden. Um möglicherweise auftretende unerwünschte Ereignisse während der T-Zellbasierten Therapie zu verhindern sollten Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt werden, welche die Wirkung der PDL-1/-2 Liganden hemmen. Es kommt dadurch zur Reaktivierung des Immunsystems und somit zur Lösung und Blockierung des inhibitorischen Signals. Durch die gesteigerte Expression von PD-1 konnten Iwasaki et al. nachweisen, dass PD-1⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen vermehrt IL-2 in der Frühphase produzieren und somit eine positive autokrine Wirkung auf die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen ausüben (85). Diese Eigenschaft könnte man bei einer Stimulierung nutzen, um zusätzlich durch die positive autokrine Wirkung eine noch stärkere Proliferation über IL-2 ermöglicht wird.

Auch die Expression des Oberflächenmoleküls CD161 wurde in der vorliegenden Arbeit unter denselben Versuchsbedingungen, wie zuvor beschrieben, untersucht. CD161

gehört zur C-Typ Lektin Superfamilie und ist ein Typ II homodimeres Oberflächenprotein (119). CD161 wird auf verschiedenen menschlichen T-Lymphozytenuntergruppen exprimiert, einschließlich auf $\gamma\delta$ T-Zellen (82,83). Die Bedeutung der CD161-Expression auf den unterschiedlichen T-Zelluntergruppen ist bislang immer noch nicht vollständig verstanden. Es konnte jedoch als Marker für Interleukin-17 produzierende T-Zellen und damit mit dem TH17-Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden und charakterisiert diese Zellen (82). CD161 exprimierende T-Zellen entsprechen aufgrund Expression weiterer Oberflächenmoleküle einem Gedächtnisphänotyp. In der vorliegenden Arbeit wurde die CD161-Expression sowohl in der Kohorte der Normalspender als auch in der Kohorte der Tumorpatienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei den Normalspendern als auch bei den Tumorpatienten unter Verwendung der unterschiedlichen Stimuli sowohl an Tag 1 als auch an Tag 8 signifikante Unterschiede ermittelt werden konnten. Bei den Normalspendern führte die Stimulation mit HMBPP, sowie BTN3A an Tag 1 zu einer signifikant höheren CD161-Expression auf den $V\delta 2+$ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle ($p=0,01$ bzw. $p=0,01$). Bei den Tumorpatienten ergab sich hier ein signifikant höheres Ergebnis für BTN3A ($p=0,02$). Für sc20.1 ergab sich in beiden Kohorten kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle. Anhand der Boxplots kann jedoch eine höhere Expression von CD161+ $V\delta 2+$ T-Zellen unter Verwendung der Stimulanzen dargestellt werden. Ähnliches gilt für die CD161-Expression an Tag 8. Hier fiel unter Verwendung fast aller Stimulanzen, sowohl bei den Normalspendern als auch bei den Tumorpatienten die Expression signifikant höher als in der Negativkontrolle aus. Die nicht ermittelten Signifikanzen könnten womöglich auf die Ausreißer in den jeweiligen Kohorten zurückzuführen sein. Auch hier kann jedoch die Tendenz zur erhöhten CD161-Expression unter Verwendung der Stimulanzen den Boxplots entnommen werden. TH17-Tellpopulationen sind sowohl an protektiven sowie an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Demnach könnte die gesteigerte CD161-Expression auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete HMBPP, als pathogenassoziiertes Antigen, zurückzuführen sein. Takahashi et al. beschrieben nach TCR-spezifischer Aktivierung eine starke Proliferation von CD4+CD161+ - sowie CD8+CD161+ T-Zellen. In der besagten Arbeitsgruppe stellten sie jedoch fest, dass die

CD8+CD161+ Subpopulation hingegen nur eine mangelnde Proliferationsfähigkeit aufweisen (84). Dies deutet darauf hin, dass die Proliferationsfähigkeit sowie Steigerung der CD161-Expression in den T-Zellsubgruppen unterschiedlich stark ausfällt und somit auch möglicherweise unterschiedliche Funktionen ausüben, zytotoxischer oder regulatorischer Funktion. Somit könnte die Erkenntnis über die CD161-Expression künftig womöglich vorab auf die Effektorfunktion der untersuchten Zellen hindeuten. Anschließend wurde untersucht, ob es bei der Expression der besagten Oberflächenantigene signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten gab. Die Expression von CD39, CD161 sowie PD1 wurden an Tag 1 sowie an Tag 8 auf Signifikanzen hin untersucht. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 8 exprimierten die Tumorpatienten signifikant höhere Mengen an CD161+ Vd2+ T-Zellen, sowohl bei der Negativkontrolle als auch unter Verwendung der verschiedenen Stimulanzen. Die gesteigerte CD161-Expression bei Tumorpatienten könnte womöglich auf eine bereits durch die Tumorerkrankung stattgefundene Immunstimulation zurückzuführen sein. Für die anderen Oberflächenantigene können zwischen den beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Fähigkeit der selektiven Stimulierung mittels des Phosphorantigens HMBPP und den beiden BTN3 Antikörpern bestätigt werden. Es konnte zudem wie erwartet hierbei ein Unterschied zwischen den beiden Kohorten detektiert werden. Dabei zeigte die Kohorte der Normalspender erwartungsgemäß eine stärkere Aktivierungs- sowie Proliferationsfähigkeit. Normalspender ließen sich signifikant besser mit HMBPP aktivieren und bei bestimmter Konzentration signifikant besser proliferieren, bei BTN3A und sc20.1 konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, allerdings anhand der Mittelwerte eine deutlich stärkere Aktivierung und Proliferation aufgezeigt werden. Außerdem konnten interessante interindividuelle Unterschiede detektiert werden, die neue Erkenntnisse brachten. Mit Hilfe der untersuchten Oberflächenmoleküle CD45RA und CD27 und der Einteilung der $\gamma\delta$ T-Zellen in unterschiedliche Subgruppen konnten so mögliche Erklärungen für die Unterschiede zwischen den Kohorten aufgezeigt werden. Normalspender zeigten signifikant höhere Anteile an naiven $\gamma\delta$ T-Zellen und nicht signifikant höhere Anteile an central memory T-Zellen, demnach eine deutliche Verschiebung in Richtung nicht differenzierter Subsets, wohingegen die Tumorkohorte signifikant höhere effector memory T-Zellen aufwies und somit eine deutliche Verschiebung in Richtung differenzierter Subsets. Dadurch kann erklärt werden, weshalb Normalspender besser aktiviert werden und besser proliferieren können. Auch die Einteilung in unterschiedliche Profile 1-6 anhand CD28, CD27 und CD16 lieferte Gründe für den Unterschied zwischen den Kohorten, wobei Normalspender der Gruppe 1 und 2, Tumorpatienten der Gruppe 3 und 4 angehörten. Durch Ermittlung weiterer signifikanter Änderungen einiger exprimierter Oberflächenmoleküle CD39, CD161 und PD1 wurde mit Hilfe der vorliegenden Arbeit bekräftigt, dass einige Faktoren betrachtet werden müssen, die die Proliferation und Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen positiv und negativ beeinflussen können. Es konnte jedoch auch erneut verdeutlicht werden, wie komplex und weitgreifend der Aktivierungsmechanismus, die damit verbundene Expansion und die Auslösung der einzelnen Effektorfunktionen ist

6. Literaturverzeichnis

1. CHAN JKC, NG CS, HUI PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies [Internet]. Vol. 12, Histopathology. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 1988 [cited 2019 Nov 3]. p. 461–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.1988.tb01967.x>
2. Fiebig H, Behn I, Gruhn R, Typlt H, Kupper H, Ambrosius H. [Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells]. *Allerg Immunol (Leipz)* [Internet]. 1984 [cited 2019 Nov 3];30(4):242–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6240938>
3. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2019 Nov 3];140(6):821–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410000759?via%3Dihub>
4. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol* [Internet]. 2011 Jan 14 [cited 2019 Nov 3];30(1):16–34. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08830185.2010.529976>
5. Medzhitov R. Approaching the Asymptote: 20 Years Later. *Immunity* [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Aug 5];30(6):766–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761309002428>
6. Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* [Internet]. 2005 [cited 2019 Nov 3];6. Available from: <http://www.nature.com/natureimmunology>
7. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. 2004. p. 11–22.
8. Hayday AC, Barber DF, Douglas N, Hoffman ES. Signals involved in gamma/delta T cell versus alpha/beta T cell lineage commitment. *Semin Immunol* [Internet]. 1999 Aug 1 [cited 2020 Apr 26];11(4):239–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104453239990180X>
9. Kreslavsky T, Gleimer M, Garbe AI, Von Boehmer H. $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ fate choice:

- counting the T-cell lineages at the branch point. *Immunol Rev* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2020 Apr 26];238(1):169–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2010.00947.x>
10. Anderson G, Moore NC, Owen JJT, Jenkinson EJ. CELLULAR INTERACTIONS IN THYMOCYTE DEVELOPMENT. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1996 Apr 28 [cited 2019 Sep 14];14(1):73–99. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.14.1.73>
 11. Pereira P, Boucontet L, Cumano A. Temporal Predisposition to $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cell Fates in the Thymus. *J Immunol* [Internet]. 2012 Feb 15 [cited 2020 Apr 26];188(4):1600–8. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/188/4/1600.short>
 12. Robey E, Fowlkes BJ. SELECTIVE EVENTS IN T CELL DEVELOPMENT I Further ANNUAL REVIEWS [Internet]. Vol. 12, *Annu. Rev. Immunol.* 1994 [cited 2020 Apr 26]. Available from: www.annualreviews.org
 13. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* [Internet]. 1999 Nov [cited 2020 Apr 26];402(6759):255–62. Available from: <http://www.nature.com/articles/46218>
 14. von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* [Internet]. 1989 Feb 1 [cited 2020 Apr 26];10(2):57–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569989903071>
 15. Germain RN. MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation Review [Internet]. Vol. 76, *Cell*. 1994 [cited 2020 Apr 26]. Available from: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(94\)90336-0.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(94)90336-0.pdf)
 16. Allison TJ, Winter CC, Fournié J-J, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* [Internet]. 2001 Jun [cited 2019 Nov 7];411(6839):820–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/35081115>
 17. 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* [Internet]. 1995;154(3):998–1006.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529807>
18. Biddison WE, Rao PE, Talle MA, Goldstein G, Shaw S. Possible involvement of the OKT4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens. Evidence from studies of cytotoxic T lymphocytes specific for SB antigens. *J Exp Med* [Internet]. 1982 Oct 1 [cited 2020 Apr 26];156(4):1065–76. Available from: <https://rupress.org/jem/article/156/4/1065/23178/Possible-involvement-of-the-OKT4-molecule-in-T>
 19. Swain SL. T Cell Subsets and the Recognition of MHC Class. *Immunol Rev* [Internet]. 1983 Sep 1 [cited 2020 Apr 26];74(1):129–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.1983.tb01087.x>
 20. 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(6075):145–9.
 21. Hayday AC. $\gamma\delta$ Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000 Apr 28 [cited 2019 Nov 6];18(1):975–1026. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.18.1.975>
 22. Morita CT, Lee HK, Wang H, Li H, Mariuzza RA, Tanaka Y. Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. *J Immunol* [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2019 Nov 7];167(1):36–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9670986>
 23. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: Discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Vol. 215, *Immunological Reviews*. 2007. p. 59–76.
 24. Bonneville M, Scotet E. Human V γ 9V δ 2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Current Opinion in Immunology*. 2006.

25. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, et al. The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem*. 2012;287(39):32780–90.
26. Chien Y, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2014 Mar 21 [cited 2019 Nov 6];32(1):121–55. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>
27. Harly C, Peigné C-M, Scotet E. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Jan 5 [cited 2019 Nov 7];5:657. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00657/abstract>
28. Kazen AR, Adams EJ. Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Jul 19 [cited 2019 Nov 7];108(29):E332-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21730193>
29. Borst J, Wicherink A, Dongen JJM Van, Vries E De, Comans-Bitter WM, Wassenaar F, et al. Non-random expression of T cell receptor γ and δ variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur J Immunol* [Internet]. 1989 Sep 1 [cited 2019 Nov 7];19(9):1559–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830190907>
30. Lefranc MP, Rabbitts TH. A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes. *Res Immunol* [Internet]. 1990 Sep [cited 2019 Nov 7];141(7):615–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2151348>
31. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné CM, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*. 2012;120(11):2269–79.
32. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, et al. Human

- lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* [Internet]. 1989 Apr 1 [cited 2019 Nov 7];169(4):1277–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2564416>
33. Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SHE, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of γ/δ T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur J Immunol* [Internet]. 1990 May 1 [cited 2019 Nov 7];20(5):1175–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830200534>
 34. Gober H-J, 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* [Internet]. 2003 Jan 20 [cited 2019 Nov 7];197(2):163–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538656>
 35. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Jul 11 [cited 2019 Nov 7];10(7):467–78. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2781>
 36. Hayday AC. $\gamma\delta$ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. *Immunity* [Internet]. 2009 Aug 21 [cited 2019 Nov 7];31(2):184–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761309003331>
 37. Kabelitz D, Kalyan S, Oberg HH, Wesch D. Human $v\delta 2$ versus non- $v\delta 2$ $\gamma\delta$ t cells in antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2013;2(3):1–7.
 38. Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy* [Internet]. 2009 Jul 3 [cited 2022 Jan 8];1(4):663–78. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/imt.09.27>
 39. Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, et al. Adaptive immune response of $V\gamma 2V\delta 2+$ T cells during mycobacterial infections. *Science* [Internet]. 2002 Mar 22 [cited 2019 Nov 7];295(5563):2255–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910108>

40. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, Sturm E, Braakman E, Klein BS, et al. Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* [Internet]. 1990 Nov 30 [cited 2019 Nov 7];250(4985):1269–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978758>
41. 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* [Internet]. 1995 May [cited 2019 Nov 7];375(6527):155–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/375155a0>
42. Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol* [Internet]. 1995 Jun 1 [cited 2019 Nov 7];154(11):5986–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751641>
43. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* [Internet]. 1994 Apr 8 [cited 2019 Nov 7];264(5156):267–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146660>
44. Altincicek B, Moll J, Campos N, Foerster G, Beck E, Hoeffler JF, et al. Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol* [Internet]. 2001 Mar 15 [cited 2019 Nov 7];166(6):3655–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550399>
45. Harwood HJ, Alvarez IM, Noyes WD, Stacpoole PW. In vivo regulation of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: increased enzyme protein concentration and catalytic efficiency in human leukemia and lymphoma. *J Lipid Res* [Internet]. 1991 Aug 1 [cited 2019 Nov 7];32(8):1237–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1770307>
46. Coscia M, Vitale C, Peola S, Foglietta M, Rigoni M, Griggio V, et al. Dysfunctional V γ 9V δ 2 T cells are negative prognosticators and markers of dysregulated

- mevalonate pathway activity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* [Internet]. 2012 Oct 18 [cited 2019 Nov 7];120(16):3271–9. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/120/16/3271/30783/Dysfunctional-Vγ9Vδ2-T-cells-are-negative>
47. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2019 Nov 7];144(5):646–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>
 48. Rohmer M, M'hamed Knani T, Simonin P, Sutter B, Sahmt H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [Internet]. Vol. 295, *Biochem. J.* 1993 [cited 2019 Nov 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1134910/pdf/biochemj00101-0187.pdf>
 49. Jomaa H, Feurle J, LÃ¼hs K, Kunzmann V, Tony H-P, Herderich M, et al. V^γ9/V^δ2 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* [Internet]. 1999 Sep 1 [cited 2019 Nov 7];25(4):371–8. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01362.x>
 50. Belmont 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* [Internet]. 1999 Nov 5 [cited 2019 Nov 7];274(45):32079–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542241>
 51. Karunakaran MM, Herrmann T. The V^γ9V^δ2 T Cell Antigen Receptor and Butyrophilin-3 A1: Models of Interaction, the Possibility of Co-Evolution, and the Case of Dendritic Epidermal T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Dec 19 [cited 2019 Nov 7];5:648. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00648/abstract>
 52. Roelofs AJ, Jauhainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson K.

- Peripheral blood monocytes are responsible for $\gamma\delta$ T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Nov 7];144(2):245–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2008.07435.x>
53. Li J, Herold MJ, Kimmel B, Müller I, Rincon-Orozco B, Kunzmann V, et al. Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2019 Nov 7];182(12):8118–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529807>
 54. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Tony FWH-P, Wilhelm M. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2019 Nov 7];96(2):384–92. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/96/2/384/52725/Stimulation-of-gamma-delta-T-cells-by-aminobisphosphonates>
 55. Dieli F, Gebbia N, Poccia F, Caccamo N, Montesano C, Fulfarò F, et al. Induction of $\gamma\delta$ T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood* [Internet]. 2003 Sep 15 [cited 2019 Nov 7];102(6):2310–1. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/102/6/2310/17221/Induction-of-gamma-delta-T-lymphocyte-effector-functions-by>
 56. Sandstrom A, Peigné CM, Léger A, Crooks J, Konczak F, Gesnel MC, et al. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human $V\gamma 9V\delta 2$ T Cells. *Immunity*. 2014;40(4):490–500.
 57. Wang H, Henry O, Distefano MD, Wang Y-C, Räikkönen J, Mönkkönen J, et al. Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human $V\gamma 2V\delta 2$ T cells. *J Immunol* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2019 Jul 9];191(3):1029–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23833237>
 58. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El Daker S, et al.

- Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(9):908–16.
59. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné C-M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood* [Internet]. 2012 Sep 13 [cited 2019 Nov 7];120(11):2269–79. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/120/11/2269/30207/Key-implication-of-CD277butyrophilin3-BTN3A-in>
60. Arnett HA, Escobar SS, Viney JL. Regulation of costimulation in the era of butyrophilins. *Cytokine* [Internet]. 2009;46(3):370–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.03.009>
61. Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, Beck S, Trowsdale J. The Cluster of BTN Genes in the Extended Major Histocompatibility Complex. *Genomics* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2019 Nov 10];71(3):351–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754300964061>
62. D’Cruz AA, Babon JJ, Norton RS, Nicola NA, Nicholson SE. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity [Internet]. Vol. 22, *Protein Science*. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cited 2019 Nov 3]. p. 1–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pro.2185>
63. Boutin L, Scotet E. Towards deciphering the hidden mechanisms that contribute to the antigenic activation process of human V γ 9V δ 2 T cells. *Front Immunol*. 2018;9(APR):1–9.
64. Wang H, Morita CT. Sensor Function for Butyrophilin 3A1 in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human V γ 2V δ 2 T Cells. *J Immunol*. 2015;195(10).
65. Hsiao C-HC, Lin X, Barney RJ, Shippy RR, Li J, Vinogradova O, et al. Synthesis of a Phosphoantigen Prodrug that Potently Activates V γ 9V δ 2 T-Lymphocytes. *Chem Biol* [Internet]. 2014 Aug 14 [cited 2019 Nov 10];21(8):945–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552114002087>
66. Gu S, Sachleben JR, Boughter CT, Nawrocka WI, Borowska MT, Tarrasch JT, et al. Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (BTN3A1)

- and its implication on V γ 9V δ 2 T cell activation. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(35):E7311–20.
67. Salim M, Knowles TJ, Baker AT, Davey MS, Jeeves M, Sridhar P, et al. BTN3A1 Discriminates $\gamma\delta$ T Cell Phosphoantigens from Nonantigenic Small Molecules *via* a Conformational Sensor in Its B30.2 Domain. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2017 Oct 20 [cited 2019 Nov 10];12(10):2631–43. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.7b00694>
 68. Nguyen K, Li J, Puthenveetil R, Lin X, Poe MM, Hsiao CHC, et al. The butyrophilin 3A1 intracellular domain undergoes a conformational change involving the juxtamembrane region. *FASEB J*. 2017;31(11):4697–706.
 69. Grabovac I, Smith L, Jackson SE, Yang L. Gastrointestinal cancer. In: *Encyclopedia of Biomedical Gerontology* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2020 Mar 25]. p. 128–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383112899>
 70. AL-Ishaq RK, Overy AJ, Büsselberg D. Phytochemicals and Gastrointestinal Cancer: Cellular Mechanisms and Effects to Change Cancer Progression. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Jan 8 [cited 2020 Feb 3];10(1):105. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/1/105>
 71. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* [Internet]. 2005 Nov 19 [cited 2020 Apr 26];366(9499):1784–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605677252>
 72. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2020 Apr 26];68(6):394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
 73. Fahrmeir L, Heumann C, Künstler R, Pigeot I, Tutz G. Wahrscheinlichkeitsrechnung. In 2016 [cited 2022 Jan 9]. p. 165–207. Available

from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-50372-0_4

74. Starick L, Riano F, Karunakaran MM, Kunzmann V, Li J, Kreiss M, et al. Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates V γ 9V δ 2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation. *Eur J Immunol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2020 Jul 12];47(6):982–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201646818>
75. Amslinger S, Kis K, Hecht S, Adam P, Rohdich F, Arigoni D, et al. Biosynthesis of Terpenes. Preparation of (E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-Diphosphate, an Intermediate of the Deoxyxylulose Phosphate Pathway †. 2002 [cited 2020 Jul 12]; Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
76. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, et al. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Aug 4 [cited 2019 Sep 10];198(3):391–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900516>
77. Ryan PL, Sumaria N, Holland CJ, Bradford CM, Izotova N, Grandjean CL, et al. Heterogeneous yet stable V δ 2 (+) T-cell profiles define distinct cytotoxic effector potentials in healthy human individuals. 2016 [cited 2020 Jul 12];113(50):14378–83. Available from: <https://www.pnas.org/content/pnas/113/50/14378.full.pdf>
78. Gruenbacher G, Gander H, Rahm A, Idzko M, Nussbaumer O, Thurnher M. Ecto-ATPase CD39 Inactivates Isoprenoid-Derived V γ 9V δ 2 T Cell Phosphoantigens. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Jul 12 [cited 2021 Jan 31];16(2):444–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124716307288>
79. Hoeres T, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J, Wilhelm M. PD-1 signaling modulates interferon- γ production by Gamma Delta ($\gamma\delta$) T-Cells in response to leukemia. *Oncoimmunology* [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 28];8(3):1550618. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30723581>
80. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jan 31];2:36. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566826>

81. Otsuka A, Hanakawa SM, Miyachi Y, Kabashima K. CD39: A new surface marker of mouse regulatory $\gamma\delta$ T cells. 2013 [cited 2021 Jan 31]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.009>
82. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, et al. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur J Immunol* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2020 Jun 22];40(8):2174–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200940257>
83. Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, et al. Phenotypic and Cytokine Analysis of Human Peripheral Blood $\gamma\delta$ T Cells Expressing N K Cell Receptors' [Internet]. Vol. 159, *The Journal of Immunology*. 1997 [cited 2020 Jun 22]. Available from: <http://www.jimmunol.org/>
84. Takahashi T, Dejbakhsh-Jones S, Strober S, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2022 Jan 8];176(1):211–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352254>
85. Iwasaki M, Tanaka Y, Kobayashi H, Murata-Hirai K, Miyabe H, Sugie T, et al. Expression and function of PD-1 in human $\gamma\delta$ T cells that recognize phosphoantigens. *Eur J Immunol* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2020 Dec 6];41(2):345–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201040959>
86. Yang Y, Li L, Yuan L, Zhou X, Duan J, Xiao H, et al. A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated V γ 9V δ 2 T Cell Activation. *Immunity* [Internet]. 2019 Apr 16 [cited 2020 Oct 23];50(4):1043-1053.e5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761319300834>
87. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2021 Jan 31];19(10):625–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491413001275>

88. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2020 Oct 23];47(6):946–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201646837>
89. Kunzmann V, Wilhelm M. Anti-lymphoma effect of $\gamma\delta$ T cells. 2009 [cited 2021 Jan 31]; Available from: <https://doi.org/10.1080/10428190500051893>
90. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Tony FWH-P, Wilhelm M. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2021 Jan 31];96(2):384–92. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/96/2/384/140684/Stimulation-of-gamma-delta-T-cells-by-aminobisphosphonates>
91. Wilhelm M, Smetak M, Schaefer-Eckart K, Kimmel B, Birkmann J, Einsele H, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells. *J Transl Med* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2021 Jan 31];12(1):45. Available from: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-12-45>
92. Davey MS, Morgan MP, Liuzzi AR, Tyler CJ, Khan MWA, Szakmany T, et al. Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells. *J Immunol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2022 Jan 6];193(7):3704–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165152>
93. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, et al. Targeting Human $\gamma\delta$ T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2021 Jan 31];67(15):7450–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671215>
94. Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2021 Jan 31];160(2):123–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12090>
95. Dieli F, Sireci G, Di Sano C, Romano A, Titone L, Di Carlo P, et al. Ligand-Specific

- $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cell Responses in Childhood Tuberculosis. *J Infect Dis* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2021 Jan 31];181(1):294–301. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315180>
96. Chen ZW, Letvin NL. Adaptive immune response of V γ 2V δ 2 T cells: a new paradigm. *Trends Immunol* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2021 Jan 31];24(4):213–9. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490603000322?casa_token=azOG61AbMcQAAAAA:yvcvnQfgUhdVFsdgj4kN13uFncVspChVdwyfJ6hmSQKul_hwGTaQctg--i_pz3GbudK4oKk80w
 97. 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* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2021 Jan 31];168(3):1484–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801693>
 98. Ye J, Ma C, Hsueh EC, Eickhoff CS, Zhang Y, Varvares MA, et al. Tumor-derived $\gamma\delta$ regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *J Immunol* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2021 Jan 31];190(5):2403–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355732>
 99. Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournié J-J, et al. A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2021 Jan 31];39(3):752–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200838812>
 100. Oberg H-H, Kellner C, Gonnermann D, Peipp M, Peters C, Sebens S, et al. $\gamma\delta$ T cell activation by bispecific antibodies. *Cell Immunol* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Jan 31];296(1):41–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874915000957>
 101. 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* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2021 Jan 31];175(4):2144–51. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081780>

102. Rei M, Gonçalves-Sousa N, Lança T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27(-) V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Aug 26 [cited 2021 Jan 31];111(34):E3562-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25114209>
103. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Blessenohl M, Westermann J, Zeitz M, et al. Human peripheral $\gamma\delta$ T cells possess regulatory potential. *Immunology* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2021 Jan 31];128(4):580–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2009.03162.x>
104. Paul S, Singh AK, Shilpi, Lal G. Phenotypic and Functional Plasticity of Gamma–Delta ($\gamma\delta$) T Cells in Inflammation and Tolerance. *Int Rev Immunol* [Internet]. 2014 Nov 2 [cited 2021 Jan 31];33(6):537–58. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08830185.2013.863306>
105. Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin 17–producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 Apr 8 [cited 2021 Jan 31];10(4):427–36. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.1717>
106. Sperling AI, Linsley PS, Barrett TA, Bluestone JA. CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor-gamma delta+ T lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 1993 Dec 1 [cited 2021 Jan 31];151(11):6043–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245449>
107. Nedellec S, Sabourin C, Bonneville M, Scotet E. NKG2D costimulates human V gamma 9V delta 2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2021 Jan 31];185(1):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511557>
108. Collins C, Shi C, Russell JQ, Fortner KA, Budd RC, Nomoto K. Activation of gamma delta T cells by *Borrelia burgdorferi* is indirect via a TLR- and caspase-dependent pathway. *J Immunol* [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2021 Jan 31];181(4):2392–8.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636256>

109. Paul S, Shilpi, Lal G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2021 Jan 31];97(2):259–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3RU0914-443R>
110. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jan 8]; Available from: www.nature.com/reviews/immunol
111. Eltzschig HK, Sitkovsky M V., Robson SC. Purinergic Signaling during Inflammation. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Dec 13 [cited 2022 Jan 8];367(24):2322–33. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1205750>
112. Hu G, Wu P, Cheng P, Zhang Z, Wang Z, Yu X, et al. Tumor-infiltrating CD39⁺ $\gamma\delta$ Tregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017 Feb 6 [cited 2020 Nov 19];6(2):e1277305. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2016.1277305>
113. Tan DBA, Ong NE, Zimmermann M, Price P, Moodley YP. An evaluation of CD39 as a novel immunoregulatory mechanism invoked by COPD. *Hum Immunol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2022 Jan 8];77(10):916–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0198885916301604>
114. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Jan 8];276(1):121–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12528>
115. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Feb 27 [cited 2022 Jan 8];104(9):3360–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360651>
116. Terawaki S, Tanaka Y, Nagakura T, Hayashi T, Shibayama S, Muroi K, et al.

- Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1-expressing cells: possible application to enhance T cell function. *Int Immunol* [Internet]. 2007 Jun 22 [cited 2022 Jan 8];19(7):881–90. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxm059>
117. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. 2003 May 1;9(5):562–7.
 118. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Sep 17 [cited 2022 Jan 8];99(19):12293–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218188>
 119. Rosen DB, Cao W, Avery DT, Tangye SG, Liu Y-J, Houchins JP, et al. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2022 Jan 8];180(10):6508–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759869>
 120. Eckey, H. F., & Türck, M. (2006). Statistische Signifikanz (p-Wert). *WiSt-Wirtschaftswissenschaftliches Studium*, 35(7), 415-418.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BrHPP	Bromhydrinpyrophosphat
BTN	Butyrophilin
BTN3A	Butyrophilin 3A Proteinfamilie
CD	Cluster of differentiation
CM	central memory T-Zellen
diff.	differenziert
DN	Doppelt Negativ
DP	Doppelt Positiv
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	effector memory T-Zellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fötale Kälberserum
FPPS	Farnesylpyrophosphat-Synthase
GI	gastrointestinal
GI-Tumore	Gastrointestinale Tumore
HD	healthy donor
HEP	hepatisch
HLA	human leukocyte antigen
HMBPP	4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enylpyrophosphat
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A-Reduktase
IL-2	Interleukin 2 (Proleukin)
INFγ	Interferon gamma
IPP	Isopentenylpyrophosphat
JTM	Juxtamembrandomäne
m	männlich
mAb 20.1	monoklonalen BTN3A Antikörper
MAX	Maximum
MD	Molekulardynamik
MEAN	Mittelwert
MEP	Methylerythritolphosphatweg
MHC	major histocompatibility complex
MIN	Minimum
NaCl	Natriumchlorid

n-BPs	Aminobisphosphonate
NH₄CL	Ammoniumchlorid
NMR	nuclear magnetic resonance
pAg	Phosphoantigen
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
PRY/SPRY	Aminosäuresequenz
sc20.1	single chain Konstrukt BTN3A Antikörper
SD	Standardabweichung
SI	Stimulationsindex
SPSS	Statistikprogramm
Tab.	Tabelle
TEMRA	effector memory T cells re-expressing CD45RA
TLR	Toll-like Rezeptor
TNM	Classification of Malignant Tumors
TZR	T-Zell-Rezeptor
w	weiblich

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der unterschiedlichen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.....	3
Abbildung 2: Darstellung unterschiedlicher Rezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Zellen und deren passenden Liganden (körpereigene und körperfremde) die zur Auslösung der dargestellten Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen führen.....	8
Abbildung 3: Darstellung des Mevalonatwegs und des Nichtmevalonatwegs.....	10
Abbildung 4: Die Proteine der BTN3A-Familie.	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des untersuchten Patientenkollektivs	31
Abbildung 6: Patientenkollektiv	31
Abbildung 7: Repräsentative FACS-Analyse der CD3 ⁺ T-Zellen (A) und dessen weitere Messung und Darstellung der aus den CD3 ⁺ -Lymphozyten gemessenen V δ 2 ⁺ T-Zellen mittels APC-Fluoreszenz anhand des Beispiels eines Normalspenders (B), sowie die Darstellung der durchgeführten Gatingstrategie auf die CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen mittels PC7-Fluoreszenz (C).	33
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der CD69 Expression am Beispiel eines Normalspenders (HD9).	35
Abbildung 9: Expression von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimuli am Beispiel eines Normalspenders HD9.....	35
Abbildung 10: Beispiel der CD69 Expression eines Tumorpatienten (GI1).....	36
Abbildung 11: Graphische Darstellung der prozentualen CD69 Expression mit den unterschiedlichen Stimuli am Beispiel eines Tumorpatienten (GI1).....	37
Abbildung 12: Graphische Darstellung der ermittelten SI-Mittelwerte für die Aktivierung bzw. CD69 Expression an Tag 1	39
Abbildung 13: Vergleich der ermittelten Stimulationsindizes der CD69 Expression bzw. Aktivierung der V δ 2 ⁺ T-Zellen an Tag 1 zwischen Normalspendern und Tumorpatienten unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen	41
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten mit HMBPP 10nM als Stimulanz	42
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten mit BTN3A 20.1 0,2 μ g/ml (A) und sc20.1 2 μ g/ml (B) als Stimulanzen	43
Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normalspendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen (Negativkontrolle).....	44
Abbildung 17: Boxplots der prozentualen CD69 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen für alle Stimulanzen für Normalspender (A) und Tumorpatienten (B).....	46
Abbildung 18: Repräsentative FACS-Analyse der V δ 2 ⁺ T-Zellen Proliferation am Beispiel eines Normalspenders (HD5).	48
Abbildung 19: Repräsentative Plots der V δ 2 ⁺ T-Zellen Proliferation am Beispiel eines Tumorpatienten (GI5)	49
Abbildung 20: Graphische Darstellung der ermittelten SI-Mittelwerte für die Proliferation der V δ 2 ⁺ T-Zellen an Tag 8	52

Abbildung 21: Vergleich der ermittelten Stimulationsindizes der $V\delta 2^+$ T-Zellproliferation an Tag 8 zwischen den Normal Spendern und den Tumorpatienten unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen	54
Abbildung 22: Darstellung der $V\delta 2$ T-Zellproliferation für die Normal spenderkohorte (A) und die Tumorpatientenkohorte (B) anhand der prozentualen $V\delta 2^+$ T-Zellmenge nach achttägiger Inkubation mit den unterschiedlichen Stimulanzen und dem Wachstumsfaktor IL2	58
Abbildung 23: Darstellung der prozentualen Verteilung der proliferierten $V\delta 2^+$ T-Zellen nach achttägiger Inkubation bei Normal Spendern und Tumorpatienten mit und ohne Stimulanzen (A-G) im Vergleich	60
Abbildung 24: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Einteilung in die Subsets am Beispiel eines Normal spenders HD9 (A) und eines Tumorpatienten GI7 (B).....	62
Abbildung 25: Prozentuale Anteile an naiven $V\delta 2^+$ T-Zellen zwischen Normal Spendern und Tumorpatienten im Vergleich.....	63
Abbildung 26: Vergleich der prozentualen Anteile an effector memory $V\delta 2^+$ T-Zellen zwischen Normal Spendern und Tumorpatienten	64
Abbildung 27: Vergleich der prozentualen Anteile an CM (A) bzw. TEMRA (B) $V\delta 2^+$ T-Zellen zwischen Normal Spendern und Tumorpatienten	65
Abbildung 28: Darstellung der unterschiedlichen $V\delta 2^+$ T-Zell-Subgruppen für Normal spender (A) und Tumorpatienten (B).....	67
Abbildung 29: Repräsentative FACS-Analyse des Profils 2 (A) und des Profils 4 (B) bei einem Normal spender (HD9) und einem Tumorpatienten (GI7).....	68
Abbildung 30: Prozentuale Darstellung der CD161 Expression auf den $V\delta 2^+$ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 1 für die Normal spender (A) und die Tumorpatienten (B).....	73
Abbildung 31: Prozentuale Darstellung der CD39 Expression auf den $V\delta 2^+$ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 1 für die Normal spender (A) und die Tumorpatienten (B).....	74
Abbildung 32: Prozentuale Darstellung der PD1 Expression auf den $V\delta 2^+$ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 1 für die Normal spender (A) und die Tumorpatienten (B).....	76
Abbildung 33: Prozentuale Verteilung der $CD161^+ V\delta 2^+$ T-Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen und ohne Stimulanz für die Normal spender (A) und die Tumorpatienten (B) an Tag 8	78
Abbildung 34: Prozentuale Darstellung der CD39 Expression auf den $V\delta 2^+$ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 8 für die Normal spender (A) und die Tumorpatienten (B) an Tag 8	80
Abbildung 35: Prozentuale Darstellung der PD1 Expression auf den $V\delta 2^+$ T-Zellen unter Verwendung der unterschiedlichen Stimulanzen und ohne an Tag 8 für die Normal spender (A) und die Tumorpatienten (B).....	82
Abbildung 36: Darstellung der prozentualen Verteilung der $CD161^+ V\delta 2^+$ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen (Negativkontrolle).....	83

Abbildung 37: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten unter Verwendung von HMBPP 10nM als Stimulanz	84
Abbildung 38: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten unter Verwendung von BTN3A 0,2 als Stimulanz.	84
Abbildung 39: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten unter Verwendung von sc20.1 2 als Stimulanz.	85
Abbildung 40: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen an Tag 8	86
Abbildung 41: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten nach Anwendung von HMBPP 10nM als Stimulanz an Tag 8	87
Abbildung 42: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten nach Anwendung von HMBPP 1nM als Stimulanz an Tag 8	87
Abbildung 43: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD161 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten nach Anwendung von BTN3A 0,2 μ g/ml als Stimulanz an Tag 8	88
Abbildung 44: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD39 ⁺ V δ 2 ⁺ T-Zellen bei Normal Spendern und Tumorpatienten ohne Stimulanzen an Tag 8	88

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kulturmedien, Puffer, Zusätze, Reagenzien.....	19
Tabelle 2: Stimulanzen.....	19
Tabelle 3: Chemikalien	19
Tabelle 4: Antikörper	20
Tabelle 5: Antikörper Panel	21
Tabelle 6: Geräte	22
Tabelle 7: Variablen der CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ T-Zellen an Tag 1.....	37
Tabelle 8: Variablen der CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ T-Zellen an Tag 1 und der jeweilig ermittelte Mittelwert des Stimulationsindex (SI)	38
Tabelle 9: Prozentuale Darstellung und Vergleich der Aktivierungsfähigkeit mittels der unterschiedlichen Stimulanzen anhand der ermittelten Stimulationsindizes für die beiden untersuchten Kohorten.....	42
Tabelle 10: Signifikanzberechnung.Vergleich der Kohorten hinsichtlich ihrer Aktivierungsfähigkeit (CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ T-Zellwerte) mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz.....	45
Tabelle 11: Variablen der Messungen der Proliferation (Vδ2 ⁺ T-Zellen)	50
Tabelle 12: Variablen der Vδ2 ⁺ T-Zellen an Tag 8 und der jeweilig ermittelte Mittelwert des Stimulationsindex (SI)	51
Tabelle 13: Prozentuale Darstellung und Vergleich der Proliferationsfähigkeit mittels der unterschiedlichen Stimulanzen anhand der ermittelten Stimulationsindizes für die beiden untersuchten Kohorten.....	55
Tabelle 14: Signifikanztest.Vergleich des prozentualer Vδ2 ⁺ T-Zellenanteils mit den unterschiedlichen Stimulanzen an Tag 8 und dem prozentualen Vδ2 ⁺ T-Zellenanteil ohne Stimulanzen an Tag 0 mittels Wilcoxon-Test, jeweils für Normalspender und Tumorpatienten	56
Tabelle 15: Signifikanzberechnung.Vergleich der Normalspender und der Tumorpatienten hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit (Vδ2 ⁺ T-Zellwerte) mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz	57
Tabelle 16: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der Vδ2 ⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 0 und Tag 1	61
Tabelle 17: Signifikanzberechnung.Vergleich der Kohorten hinsichtlich ihrer Vδ2 ⁺ T-Zellwerte an Tag 0 und an Tag 1 mittels jeweils ohne Stimulanz	61
Tabelle 18: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte der unterschiedlichen Subsets im Vergleich zwischen Tumorpatienten und Normal Spendern	63
Tabelle 19: Darstellung der Variablen der Vδ2 T-Zell Subsets an Tag 0.....	66
Tabelle 20: Verteilung der Vδ2 ⁺ Profile bei den Normal Spendern und den Tumorpatienten.	68
Tabelle 21: Signifikanztest, Darstellung der p-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 1 und Tag 8	70
Tabelle 22: Signifikanztest, Darstellung der p-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 1 und Tag 8	70
Tabelle 23: Signifikanztest, Darstellung der p-Werte (asymptotische Signifikanz) der PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ T-Zellen im Vergleich von Tag 1 und Tag 8	71

Tabelle 24: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD161 ⁺ Vd2 ⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 1 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz.....	72
Tabelle 25: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD39 ⁺ Vd2 ⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 1 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz.....	73
Tabelle 26: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der PD1 ⁺ Vd2 ⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 1 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz.....	75
Tabelle 27: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD161 ⁺ Vd2 ⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 8 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz.....	77
Tabelle 28: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der CD39 ⁺ Vd2 ⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 8 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz.....	79
Tabelle 29: Signifikanztest, Darstellung der P-Werte (asymptotische Signifikanz) der PD1 ⁺ Vd2 ⁺ T-Zellen für den Vergleich von Tag 8 mit den jeweiligen Stimulanzen und ohne Stimulanz.....	81
Tabelle 30: Signifikanzberechnung.Vergleich der Normalspender und der Tumorpatienten hinsichtlich der CD161, CD39 und PD1 Oberflächenexpression an Tag 1 mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz.....	83
Tabelle 31: Signifikanzberechnung.Vergleich der Normalspender und der Tumorpatienten hinsichtlich ihrer CD161, CD39 und PD1 Oberflächenexpression an Tag 8 mittels unterschiedlicher Stimuli oder ohne Stimulanz	86

IV Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volker Kunzmann für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die Möglichkeit meine Promotionsarbeit bei ihm schreiben zu dürfen. Mit Hilfe seiner stetigen Betreuung, seiner konstruktiven Kritik und seinen Vorschlägen trug er zum Gelingen meiner Arbeit bei und unterstützte mich in jeder Phase der Arbeit.

Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit zur experimentellen Forschung und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eyrich für die Koreffferenz.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Brigitte Kimmel, die mir mit ihrem großen Engagement und ihrer liebevollen und geduligen Art insbesondere in der Laborarbeit eine sehr große Hilfe und Unterstützung war. Auch für ihre vielen hilfreichen Anmerkungen, Korrekturvorschläge und ihre Unterstützung generell in allen Phasen der Arbeit danke ich ihr sehr und weiß ihre Hilfsbereitschaft zu schätzen und nicht als selbstverständlich anzusehen.

Des Weiteren gilt mein Dank allen wissenschaftlich technischen Mitarbeiterinnen des Immunbiologischen Labors für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank gilt auch meinen Eltern und Geschwistern, die mich stets im Studium als auch während der Promotionsarbeit durch ihren Zuspruch und ihre Motivation von Beginn an bis zum Ende voller Liebe und Geduld unterstützt haben.

V Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

VI Anhang

Tabelle 32: Ränge. Anhand der dargestellten mittleren Ränge jedes untersuchten Vergleichs kann die Tabelle 10 gedeutet werden und eine Aussage über die Richtung der signifikanten Ergebnisse getroffen werden. Der höhere der beiden mittleren Ränge beim Vergleich Normalspender und Patient bestimmt die Richtig der Signifikanz, das heißt, ob der errechnete P-Wert für den Normalspender oder für den Patienten signifikant höher oder niedriger ist. Je näher die Ränge aneinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis.

<i>Ränge</i>				
	Group	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Normalspender	7	7.07	49.50
	Patienten	18	15.31	275.50
d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	Normalspender	7	17.86	125.00
	Patienten	18	11.11	200.00
d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	13.57	95.00
	Patienten	18	12.78	230.00
d1 CD69 ⁺ Vδ2 ⁺ sc20.1 2µg/ml	Normalspender	7	14.86	104.00
	Patienten	17	11.53	196.00

Tabelle 33: Ränge. Tabellarische Darstellung der ermittelten mittleren Ränge mittels des Wilcoxon-Tests. Dabei soll abgelesen werden, ob die Zahl der positiven oder negativen Ränge für jeden Vergleich höher ist. Der Hochbuchstabe des höheren Ranges dient zur Überprüfung in der Legende (a-u), welche Aussage mit der ermittelten Signifikanz verbunden ist. Diese Tabelle dient zur Deutung der Signifikanz der Tabelle 14.

<i>Ränge</i>					
Group			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d8 Vδ2+ ohne - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	6 ^a	3.67	22.00
		Positive Ränge	1 ^b	6.00	6.00
	d8 Vδ2+ HMBPP 10nM - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	0 ^d	0.00	.00
		Positive Ränge	7 ^e	4.00	28.00
	d8 Vδ2+ HMBPP 1nM - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	0 ^g	0.00	.00
		Positive Ränge	7 ^h	4.00	28.00
	d8 Vδ2+ HMBPP 0,1nM - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	0 ⁱ	0.00	.00
		Positive Ränge	7 ^k	4.00	28.00
	d8 Vδ2+ BTN3A 0.2µg/ml - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	0 ^m	0.00	.00
		Positive Ränge	7 ⁿ	4.00	28.00
	d8 Vδ2+ BTN3A 0.02µg/ml - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	0 ^p	0.00	.00
		Positive Ränge	7 ^q	4.00	28.00
	d8 Vδ2+ BTN3A 0.002µg/ml - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	0 ^s	0.00	.00
		Positive Ränge	7 ^t	4.00	28.00
Patienten	d8 Vδ2+ ohne - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	9 ^a	10.39	93.50
		Positive Ränge	9 ^b	8.61	77.50
	d8 Vδ2+ HMBPP 10nM - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	1 ^d	1.00	1.00
		Positive Ränge	17 ^e	10.00	170.00
	d8 Vδ2+ HMBPP 1nM - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	2 ^g	1.50	3.00
		Positive Ränge	16 ^h	10.50	168.00
	d8 Vδ2+ HMBPP 0,1nM - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	2 ⁱ	4.50	9.00
		Positive Ränge	16 ^k	10.13	162.00
	d8 Vδ2+ BTN3A 0.2µg/ml - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	1 ^m	4.00	4.00
		Positive Ränge	17 ⁿ	9.82	167.00

d8 Vδ2+ BTN3A 0.02µg/ml - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	2 ^p	4.00	8.00
	Positive Ränge	16 ^q	10.19	163.00
d8 Vδ2+ BTN3A 0.002µg/ml - d0 Vδ2+ gesamt	Negative Ränge	2 ^s	5.50	11.00
	Positive Ränge	16 ^t	10.00	160.00

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a. d8 Vδ2+ ohne < d0 Vδ2+ ohne | l. d8 Vδ2+ HMBPP 0,1nM = d0 Vδ2+ ohne |
| b. d8 Vδ2+ ohne > d0 Vδ2+ ohne | m. d8 Vδ2+ BTN3A 0.2µg/ml < d0 Vδ2+ ohne |
| c. d8 Vδ2+ ohne = d0 Vδ2+ ohne | n. d8 Vδ2+ BTN3A 0.2µg/ml > d0 Vδ2+ ohne |
| d. d8 Vδ2+ HMBPP 10nM < d0 Vδ2+ ohne | o. d8 Vδ2+ BTN3A 0.2µg/ml = d0 Vδ2+ ohne |
| e. d8 Vδ2+ HMBPP 10nM > d0 Vδ2+ ohne | p. d8 Vδ2+ BTN3A 0.02µg/ml < d0 Vδ2+ ohne |
| f. d8 Vδ2+ HMBPP 10nM = d0 Vδ2+ ohne | q. d8 Vδ2+ BTN3A 0.02µg/ml > d0 Vδ2+ ohne |
| g. d8 Vδ2+ HMBPP 1nM < d0 Vδ2+ ohne | r. d8 Vδ2+ BTN3A 0.02µg/ml = d0 Vδ2+ ohne |
| h. d8 Vδ2+ HMBPP 1nM > d0 Vδ2+ ohne | s. d8 Vδ2+ BTN3A 0.002µg/ml < d0 Vδ2+ ohne |
| i. d8 Vδ2+ HMBPP 1nM = d0 Vδ2+ ohne | t. d8 Vδ2+ BTN3A 0.002µg/ml > d0 Vδ2+ ohne |
| j. d8 Vδ2+ HMBPP 0,1nM < d0 Vδ2+ ohne | u. d8 Vδ2+ BTN3A 0.002µg/ml = d0 Vδ2+ ohne |
| k. d8 Vδ2+ HMBPP 0,1nM > d0 Vδ2+ ohne | |

Tabelle 34: Ränge. Anhand der dargestellten mittleren Ränge kann die Tabelle 15 gedeutet werden und eine Aussage über die Richtung der signifikanten Ergebnisse getroffen werden. Der höhere der beiden mittleren Ränge beim Vergleich Normalspender und Patient bestimmt die Signifikanz, das heißt, ob der errechnete Wert für den Normalspender oder für den Patienten signifikant höher oder niedriger ist. Je näher die Ränge aneinander liegen desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis.

Ränge	Group	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
d8 Vδ2+ ohne	Normalspender	7	10.14	71.00
	Patienten	18	14.11	254.00
d8 Vδ2+ HMBPP 10nM	Normalspender	7	16.21	113.50
	Patienten	18	11.75	211.50
d8 Vδ2+ HMBPP 1nM	Normalspender	7	16.00	112.00
	Patienten	18	11.83	213.00
d8 Vδ2+ HMBPP 0,1nM	Normalspender	7	17.71	124.00
	Patienten	18	11.17	201.00
d8 Vδ2+ BTN3A 0.2µg/ml	Normalspender	7	15.71	110.00
	Patienten	18	11.94	215.00
d8 Vδ2+ BTN3A 0.02µg/ml	Normalspender	7	15.43	108.00
	Patienten	18	12.06	217.00
d8 Vδ2+ BTN3A 0.002µg/ml	Normalspender	7	11.00	77.00
	Patienten	18	13.78	248.00

Tabelle 35: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen (Tabelle 16) gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende, die damit verbundene Aussage über die ermittelte Signifikanz treffen zu können.

Group	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d1 Vδ2+ T-Zellen ohne – d0 Vδ2+ T-Zellen ohne	Negative Ränge	4 ^a 3.75 15.00
		Positive Ränge	3 ^b 4.33 13.00
Patienten	d1 Vδ2+ T-Zellen ohne – d0 Vδ2+ T-Zellen ohne	Negative Ränge	8 ^a 9.56 76.50
		Positive Ränge	10 ^b 9.45 94.50

a. d1 Vδ2+ T-Zellen ohne < d0 Vδ2+ T-Zellen ohne
b. d1 Vδ2+ T-Zellen ohne > d0 Vδ2+ T-Zellen ohne
c. d1 Vδ2+ T-Zellen ohne = d0 Vδ2+ T-Zellen ohne

Tabelle 36: Ränge. Anhand der dargestellten mittleren Ränge jedes untersuchten Vergleichs kann die vorherige Tabelle 17 gedeutet werden und eine Aussage über die Richtung der signifikanten Ergebnisse getroffen werden. Der höhere der beiden mittleren Ränge beim Vergleich Normalspender und Patient bestimmt die Richtung der Signifikanz, das heißt, ob der errechnete P-Wert für den Normalspender oder für den Patienten signifikant höher oder niedriger ist. Je näher die Ränge aneinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis.

Ränge

	Group	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
d0 Vδ2 ⁺ T-Zellen ohne	Normalspender	7	10.93	76.50
	Patienten	18	13.81	248.50
d1 Vδ2 ⁺ T-Zellen ohne	Normalspender	7	9.43	66.00
	Patienten	18	14.39	259.00

Tabelle 37: Ränge. Vergleich der Subset Verteilung (naive,CM,EM,TEMRA) zwischen Normal Spendern und Tumorpatienten. Anhand der höheren mittleren Ränge, für das jeweilige Subset, kann die Signifikanz gedeutet werden. Dient zur Deutung der Signifikanzrichtungen der Tabelle 18.

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
naive Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	Normalspender	7	17.57	123.00
	Patienten	18	11.22	202.00
CM Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	Normalspender	7	16.29	114.00
	Patienten	18	11.72	211.00
EM Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	Normalspender	7	6.86	48.00
	Patienten	18	15.39	277.00
TEMRA Vδ2 ⁺ T-Zellen (CD45RA ⁺ CD27 ⁺)	Normalspender	7	12.00	84.00
	Patienten	18	13.39	241.00

Tabelle 38: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 21 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende, die damit verbundene Aussage über die ermittelte Signifikanz treffen zu können.

Ränge

Group			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne – d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Negative Ränge	0 ^a	0.00	0.00
		Positive Ränge	7 ^b	4.00	28.00
Patienten	d8 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne – d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Negative Ränge	0 ^a	0.00	0.00
		Positive Ränge	18 ^b	9.50	171.00

- a. d8 CD161⁺ Vδ2⁺ ohne < d1 CD161⁺ Vδ2⁺ ohne
- b. d8 CD161⁺ Vδ2⁺ ohne > d1 CD161⁺ Vδ2⁺ ohne
- c. d8 CD161⁺ Vδ2⁺ ohne = d1 CD161⁺ Vδ2⁺ ohne

Tabelle 39: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 22 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende, die damit verbundene Aussage über die ermittelte Signifikanz treffen zu können.

Ränge

Group			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne – d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Negative Ränge	0 ^a	0.00	0.00
		Positive Ränge	7 ^b	4.00	28.00
Patienten	d8 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne – d1 CD39 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Negative Ränge	1 ^a	1.00	1.00
		Positive Ränge	17 ^b	10.00	170.00

- a. d8 CD39⁺ Vδ2⁺ ohne < d1 CD39⁺ Vδ2⁺ ohne
- b. d8 CD39⁺ Vδ2⁺ ohne > d1 CD39⁺ Vδ2⁺ ohne
- c. d8 CD39⁺ Vδ2⁺ ohne = d1 CD39⁺ Vδ2⁺ ohne

Tabelle 40: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 23 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende, die damit verbundene Aussage über die ermittelte Signifikanz treffen zu können.

Ränge

Group			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne – d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Negative Ränge	0 ^a	0.00	0.00
		Positive Ränge	7 ^b	4.00	28.00
Patienten	d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne – d1 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Negative Ränge	1 ^a	1.00	1.00
		Positive Ränge	17 ^b	10.00	170.00

- a. d8 PD1⁺ Vδ2⁺ ohne < d1 PD1⁺ Vδ2⁺ ohne
- b. d8 PD1⁺ Vδ2⁺ ohne > d1 PD1⁺ Vδ2⁺ ohne
- c. d8 PD1⁺ Vδ2⁺ ohne = d1 PD1⁺ Vδ2⁺ ohne

Tabelle 41: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 24 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende zu überprüfen, welche Aussage damit verbunden ist.

Ränge

Gruppe			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	Negative Ränge	0 ^a	0.00	0.00
		Positive Ränge	7 ^b	4.00	28.00
	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne BTN3A 0,2µg/ml	Negative Ränge	0 ^d	0.00	0.00
		Positive Ränge	7 ^e	4.00	28.00
	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne sc20.1 2µg/ml	Negative Ränge	2 ^g	4.50	9.00
		Positive Ränge	5 ^h	3.80	19.00
Patienten	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP10nM	Negative Ränge	3 ^a	9.67	29.00
		Positive Ränge	15 ^b	9.47	142.00
	d1 CD161 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne				

d1 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml	Negative Ränge	5 ^d	6.80	34.00
-	Positive Ränge	13 ^e	10.54	137.00
d1 CD161+ Vδ2+ ohne				
d1 CD161+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml	Negative Ränge	9 ^a	10.00	90.00
-	Positive Ränge	8 ^b	7.88	63.00
d1 CD161+ Vδ2+ ohne				

a. d1 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM < d1 CD161+ Vδ2+ ohne
b. d1 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM > d1 CD161+ Vδ2+ ohne
c. d1 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM = d1 CD161+ Vδ2+ ohne
d. d1 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml < d1 CD161+ Vδ2+ ohne
e. d1 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml > d1 CD161+ Vδ2+ ohne
f. d1 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml = d1 CD161+ Vδ2+ ohne
g. d1 CD161+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml < d1 CD161+ Vδ2+ ohne
h. d1 CD161+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml > d1 CD161+ Vδ2+ ohne
i. d1 CD161+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml = d1 CD161+ Vδ2+ ohne

Tabelle 42: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 25 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende zu überprüfen, welche Aussage damit verbunden ist.

Ränge

Group		N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
Normalspender	d1 CD39+ Vδ2+ HMBPP10nM	Negative Ränge	1 ^a	2.00	2.00
	-	Positive Ränge	6 ^b	4.33	26.00
	d1 CD39+ Vδ2+ ohne				
	d1 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml	Negative Ränge	4 ^d	4.00	16.00
	-	Positive Ränge	3 ^e	4.00	12.00
	d1 CD39+ Vδ2+ ohne				
	d1 CD39+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml	Negative Ränge	5 ^a	4.20	21.00
	-	Positive Ränge	2 ^b	3.50	7.00
	d1 CD39+ Vδ2+ ohne				
	Patienten	d1 CD39+ Vδ2+ HMBPP10nM	Negative Ränge	2 ^a	6.00
-		Positive Ränge	16 ^b	9.94	159.00
d1 CD39+ Vδ2+ ohne					
d1 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml		Negative Ränge	5 ^d	8.00	40.00
-		Positive Ränge	13 ^e	10.08	131.00
d1 CD39+ Vδ2+ ohne					
d1 CD39+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml		Negative Ränge	11 ^a	7.73	85.00
-		Positive Ränge	6 ^b	11.33	68.00
d1 CD39+ Vδ2+ ohne					

a. d1 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM < d1 CD39+ Vδ2+ ohne
b. d1 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM > d1 CD39+ Vδ2+ ohne
c. d1 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM = d1 CD39+ Vδ2+ ohne
d. d1 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml < d1 CD39+ Vδ2+ ohne
e. d1 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml > d1 CD39+ Vδ2+ ohne
f. d1 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml = d1 CD39+ Vδ2+ ohne
g. d1 CD39+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml < d1 CD39+ Vδ2+ ohne
h. d1 CD39+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml > d1 CD39+ Vδ2+ ohne
i. d1 CD39+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml = d1 CD39+ Vδ2+ ohne

Tabelle 43: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 26 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende zu überprüfen, welche Aussage damit verbunden ist.

Ränge			N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
Normalspender	d1 PD1+ Vδ2+	Negative Ränge	1 ^a	0.00	0.00	
	HMBPP10nM	Positive Ränge	6 ^b	4.00	28.00	
	d1 PD1+ Vδ2+ ohne					
	d1 PD1+ Vδ2+	Negative Ränge	4 ^d	0.00	0.00	
	BTN3A 0,2µg/ml	Positive Ränge	3 ^e	4.00	28.00	
	d1 PD1+ Vδ2+ ohne					
	d1 PD1+ Vδ2+	Negative Ränge	5 ^g	0.00	0.00	
	sc20.1 2µg/ml	Positive Ränge	2 ^h	3.50	21.00	
	d1 PD1+ Vδ2+ ohne					
	Patienten	d1 PD1+ Vδ2+	Negative Ränge	3 ^a	2.67	8.00
		HMBPP10nM	Positive Ränge	13 ^b	9.85	128.00
		d1 PD1+ Vδ2+ ohne				
d1 PD1+ Vδ2+		Negative Ränge	2 ^d	4.50	9.00	
BTN3A 0,2µg/ml		Positive Ränge	16 ^e	10.13	162.00	
d1 PD1+ Vδ2+ ohne						
d1_PD1+_Vδ2+		Negative Ränge	5 ^g	6.40	32.00	
sc20.1 2µg/ml		Positive Ränge	11 ^h	9.45	104.00	
d1_PD1+_Vδ2+ ohne						
a. d1 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM < d1 PD1+ Vδ2+ ohne			f. d1 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml = d1 PD1+ Vδ2+ ohne			
b. d1 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM > d1 PD1+ Vδ2+ ohne			g. d1 PD1+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml < d1 PD1+ Vδ2+ ohne			
c. d1 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM = d1 PD1+ Vδ2+ ohne			h. d1 PD1+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml > d1 PD1+ Vδ2+ ohne			
d. d1 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml < d1 PD1+ Vδ2+ ohne			i. d1 PD1+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml = d1 PD1+ Vδ2+ ohne			
e. d1 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml > d1 PD1+ Vδ2+ ohne						

Tabelle 44: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 27 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende zu überprüfen, welche Aussage damit verbunden ist.

Ränge			N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
Normalspender	d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM –	Negative Ränge	1 ^a	1.00	1.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	6 ^b	4.50	27.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 1nM –					
	d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Negative Ränge	1 ^d	2.00	2.00	
		Positive Ränge	6 ^e	4.33	26.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM –					
	d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Negative Ränge	1 ^g	1.00	1.00	
		Positive Ränge	6 ^h	4.50	27.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml –					
	d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Negative Ränge	2 ^j	2.50	5.00	
		Positive Ränge	5 ^k	4.60	23.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,02µg/ml –					
	d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Negative Ränge	1 ^m	1.00	1.00	
		Positive Ränge	6 ⁿ	4.50	27.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,002µg/ml –					
	–	Negative Ränge	1 ^p	1.00	1.00	
	d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	6 ^q	4.50	27.00	
	Patienten	d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM –	Negative Ränge	3 ^a	2.33	7.00
d8 CD161+ Vδ2+ ohne		Positive Ränge	15 ^b	10.93	164.00	
d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 1nM –						
d8 CD161+ Vδ2+ ohne		Negative Ränge	4 ^d	10.00	40.00	
		Positive Ränge	14 ^e	9.36	131.00	

d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM –	Negative Ränge	4 ^g	10.50	42.00
d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	14 _h	9.21	129.00
d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml –	Negative Ränge	3 ^j	4.67	14.00
d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	15 _k	10.47	157.00
d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml –	Negative Ränge	7 ^m	5.71	40.00
d8 CD161+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	11 _n	11.91	131.00
d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml –	Negative Ränge	6 ^p	5.50	33.00
–	Positive Ränge	12 _q	11.50	138.00
d8 CD161+ Vδ2+ ohne				

- a. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM < d8 CD161+ Vδ2+ ohne
b. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM > d8 CD161+ Vδ2+ ohne
c. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM = d8 CD161+ Vδ2+ ohne
d. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 1nM < d8 CD161+ Vδ2+ ohne
e. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 1nM > d8 CD161+ Vδ2+ ohne
f. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 1nM = d8 CD161+ Vδ2+ ohne
g. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM < d8 CD161+ Vδ2+ ohne
h. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM > d8 CD161+ Vδ2+ ohne
i. d8 CD161+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM = d8 CD161+ Vδ2+ ohne

- j. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml < d8 CD161+ Vδ2+ ohne
k. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml > d8 CD161+ Vδ2+ ohne
l. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml = d8 CD161+ Vδ2+ ohne
m. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml < d8 CD161+ Vδ2+ ohne
n. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml > d8 CD161+ Vδ2+ ohne
o. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml = d8 CD161+ Vδ2+ ohne
p. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml < d8 CD161+ Vδ2+ ohne
q. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml > d8 CD161+ Vδ2+ ohne
r. d8 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml = d8 CD161+ Vδ2+ ohne

Tabelle 45: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 28 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende zu überprüfen, welche Aussage damit verbunden ist.

Ränge					
Gruppe			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM –	Negative Ränge	1 ^a	1.00	1.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	6 ^b	4.50	27.00
	d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 1nM –	Negative Ränge	1 ^d	1.00	1.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	6 ^e	4.50	27.00
	d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM –	Negative Ränge	1 ^g	1.00	1.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	6 ^h	4.50	27.00
	d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml –	Negative Ränge	0 ^j	0.00	.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	7 ^k	4.00	28.00
	d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml –	Negative Ränge	0 ^m	0.00	0.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	7 ⁿ	4.00	28.00
	d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml –	Negative Ränge	0 ^p	0.00	0.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	7 ^q	4.00	28.00
Patienten	d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM –	Negative Ränge	1 ^a	2.00	2.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	17 _b	9.94	169.00
	d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 1nM –	Negative Ränge	1 ^d	2.00	2.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	17 _e	9.94	169.00
	d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM –	Negative Ränge	1 ^g	2.00	2.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	17 _h	9.94	169.00
	d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml –	Negative Ränge	0 ^j	0.00	0.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	18 _k	9.50	171.00
	d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml –	Negative Ränge	0 ^m	0.00	0.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	18 _n	9.50	171.00
	d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml –	Negative Ränge	0 ^p	0.00	0.00
	d8 CD39+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	18 _q	9.50	171.00

- a. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM < d8 CD39+ Vδ2+ ohne
b. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM > d8 CD39+ Vδ2+ ohne
c. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM = d8 CD39+ Vδ2+ ohne
d. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 1nM < d8 CD39+ Vδ2+ ohne
e. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 1nM > d8 CD39+ Vδ2+ ohne
f. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 1nM = d8 CD39+ Vδ2+ ohne
g. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM < d8 CD39+ Vδ2+ ohne
h. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM > d8 CD39+ Vδ2+ ohne
i. d8 CD39+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM = d8 CD39+ Vδ2+ ohne

- j. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml < d8 CD39+ Vδ2+ ohne
k. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml > d8 CD39+ Vδ2+ ohne
l. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2μg/ml = d8 CD39+ Vδ2+ ohne
m. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml < d8 CD39+ Vδ2+ ohne
n. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml > d8 CD39+ Vδ2+ ohne
o. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,02μg/ml = d8 CD39+ Vδ2+ ohne
p. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml < d8 CD39+ Vδ2+ ohne
q. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml > d8 CD39+ Vδ2+ ohne
r. d8 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,002μg/ml = d8 CD39+ Vδ2+ ohne

Tabelle 46: Ränge. Anhand der mittleren Ränge kann die Richtung der ermittelten Signifikanzen der Tabelle 29 gedeutet werden. Zur Interpretation werden die Hochbuchstaben des höheren Ranges (positive Ränge oder negative Ränge) verwendet, um in der Legende zu überprüfen, welche Aussage damit verbunden ist.

<i>Ränge</i>					
Group			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalspender	d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM –	Negative Ränge	7 ^a	4.00	28.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	0 ^b	0.00	0.00
	d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 1nM –	Negative Ränge	7 ^d	4.00	28.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	0 ^e	0.00	0.00
	d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM –	Negative Ränge	6 ^g	4.33	26.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	1 ^h	2.00	2.00
	d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml –	Negative Ränge	2 ^j	5.50	11.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	5 ^k	3.40	17.00
	d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,02µg/ml –	Negative Ränge	2 ^m	6.00	12.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	5 ⁿ	3.20	16.00
	d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,002µg/ml –	Negative Ränge	4 ^p	4.00	16.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	3 ^q	4.00	12.00
Patienten	d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM –	Negative Ränge	15 ^a	9.27	139.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	3 ^b	10.67	32.00
	d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 1nM –	Negative Ränge	17 ^d	9.76	166.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	1 ^e	5.00	5.00
	d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM –	Negative Ränge	16 ^g	10.00	160.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	2 ^h	5.50	11.00
	d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml –	Negative Ränge	2 ^j	4.00	8.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	16 ^k	10.19	163.00
	d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,02µg/ml –	Negative Ränge	4 ^m	6.50	26.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	14 ⁿ	10.36	145.00
	d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,002µg/ml –	Negative Ränge	5 ^p	8.60	43.00
	d8 PD1+ Vδ2+ ohne	Positive Ränge	13 ^q	9.85	128.00

- a. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM < d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- b. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM > d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- c. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM = d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- d. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 1nM < d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- e. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 1nM > d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- f. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 1nM = d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- g. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM < d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- h. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM > d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- i. d8 PD1+ Vδ2+ HMBPP 0,1nM = d8 PD1+ Vδ2+ ohne

- j. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml < d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- k. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml > d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- l. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml = d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- m. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,02µg/ml < d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- n. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,02µg/ml > d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- o. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,02µg/ml = d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- p. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,002µg/ml < d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- q. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,002µg/ml > d8 PD1+ Vδ2+ ohne
- r. d8 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,002µg/ml = d8 PD1+ Vδ2+ ohne

Tabelle 47: Ränge. Anhand der dargestellten mittleren Ränge kann die vorherige Tabelle 30 gedeutet werden und eine Aussage über die Richtung der signifikanten Ergebnisse getroffen werden. Der höhere der beiden mittleren Ränge beim Vergleich Normalspender und Patient bestimmt die Signifikanz, das heißt, ob der errechnete Wert für den Normalspender oder für den Patienten signifikant höher oder niedriger ist. Je näher die Ränge aneinander liegen desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis.

<i>Ränge</i>				
	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
d1 CD161+ Vδ2+ ohne	Normalspender	7	7.21	50.50
	Patienten	18	15.25	274.50
d1 CD161+ Vδ2+ HMBPP 10nM	Normalspender	7	7.71	54.00
	Patienten	18	15.06	271.00
d1 CD161+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	7.86	55.00
	Patienten	18	15.00	270.00
d1 CD161+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml	Normalspender	7	8.29	58.00
	Patienten	17	14.24	242.00
d1 CD39+ Vδ2+ ohne	Normalspender	7	15.00	105.00
	Patienten	18	12.22	220.00
d1 CD39+ Vδ2+ HMBPP 10nM	Normalspender	7	14.14	99.00
	Patienten	18	12.56	226.00
d1 CD39+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	12.71	89.00
	Patienten	18	13.11	236.00
d1 CD39+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml	Normalspender	7	14.29	100.00
	Patienten	17	11.76	200.00
d1 PD1+ Vδ2+ ohne	Normalspender	7	11.64	81.50
	Patienten	18	13.53	243.50
d1 PD1+ Vδ2+ HMBPP 10nM	Normalspender	7	16.14	113.00
	Patienten	18	11.78	212.00
d1 PD1+ Vδ2+ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	12.71	89.00
	Patienten	18	13.11	236.00
d1 PD1+ Vδ2+ sc20.1 2µg/ml	Normalspender	7	13.57	95.00
	Patienten	17	12.06	205.00

Tabelle 48: Ränge. Anhand der dargestellten mittleren Ränge kann die vorherige Tabelle 31 gedeutet werden und eine Aussage über die Richtung der signifikanten Ergebnisse getroffen werden. Der höhere der beiden mittleren Ränge beim Vergleich Normalspender und Patient bestimmt die Signifikanz, das heißt, ob der errechnete Wert für den Normalspender oder für den Patienten signifikant höher oder niedriger ist. Je näher die Ränge aneinander liegen desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis.

<i>Ränge</i>				
	Group	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	Normalspender	7	8.86	62.00
	Patienten	18	14.61	263.00
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 10nM	Normalspender	7	7.14	50.00
	Patienten	18	15.28	275.00
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 1nM	Normalspender	7	8.14	57.00
	Patienten	18	14.89	268.00
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 0.1nM	Normalspender	7	9.71	68.00
	Patienten	17	14.28	257.00
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	6.57	46.00
	Patienten	18	15.50	279.00
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml	Normalspender	7	9.86	69.00
	Patienten	18	14.22	256.00
d8 CD161 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml	Normalspender	7	9.29	65.00
	Patienten	18	14.44	260.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ ohne	Normalspender	7	17.29	121.00
	Patienten	17	11.33	204.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 10nM	Normalspender	7	13.14	92.00
	Patienten	18	12.94	233.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 1nM	Normalspender	7	13.14	92.00
	Patienten	18	12.94	233.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ HMBPP 0,1nM	Normalspender	7	13.86	97.00
	Patienten	18	12.67	228.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	11.57	81.00
	Patienten	18	13.56	244.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml	Normalspender	7	14.00	98.00
	Patienten	18	12.61	227.00
d8 CD39 ⁺ Vd2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml	Normalspender	7	13.00	91.00
	Patienten	18	13.00	234.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ ohne	Normalspender	7	13.14	92.00
	Patienten	18	12.94	233.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 10nM	Normalspender	7	11.14	78.00
	Patienten	18	13.72	247.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 1nM	Normalspender	7	12.43	87.00
	Patienten	18	13.22	238.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ HMBPP 0,1nM	Normalspender	7	11.43	80.00
	Patienten	18	13.61	245.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,2µg/ml	Normalspender	7	9.57	67.00
	Patienten	18	14.33	258.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,02µg/ml	Normalspender	7	10.57	74.00
	Patienten	18	13.94	251.00
d8 PD1 ⁺ Vδ2 ⁺ BTN3A 0,002µg/ml	Normalspender	7	10.00	70.00
	Patienten	18	14.17	255.00