

**Aktivierung CD8 α -charakterisierter $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen
bei verschiedenen Hühnerlinien**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. Christina Polasky,

geboren am 15.09.1989 in Erfurt

Gutachterinnen: Prof. Dr. Ilse Jacobsen (FSU Jena)

Prof. Dr. Berit Jungnickel (FSU Jena)

Prof. Dr. Daniela Wesch (UK-SH Kiel)

Tag der Disputation: 10. Mai 2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	8
Summary.....	10
1. Einleitung.....	12
1.1 $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	12
1.2 Vergleich zu $\alpha\beta$ -T-Zellen.....	12
1.3 Stellung der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Immunsystem.....	13
1.4 Funktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	14
1.5 $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen.....	15
1.6 Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	17
1.7 Aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	18
2. Salmonellen.....	20
2.1 Einteilung und Bedeutung der Salmonellen.....	20
2.2 Interaktion von Salmonellen mit dem Immunsystem und die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	21
3. Vergleich von Legehennen Linien.....	22
4. Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien.....	26
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	26
2.1.3 Kits und Fertiglösungen.....	27
2.1.4 Reagenzien für die Zellisolation und Zellkulturversuche.....	27
2.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien.....	28
2.1.6 Primer.....	28
2.1.7 Puffer und Fertiglösungen.....	29
2.1.8 Geräte.....	29
2.1.9 Software.....	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Bakteriologie und Tierversuche.....	30
2.2.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	30
2.2.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung.....	30
2.2.1.3 Immunisierungsversuch und Probenentnahme.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.4	Verarbeitung der EDTA-Blutproben.....	32
2.2.2	Zellbiologische Arbeiten	32
2.2.2.1	Verarbeitung der Heparin-Blutproben.....	32
2.2.2.2	Färbung der Zellen mit Proliferationsfarbstoff.....	33
2.2.2.3	Zellkultur der primären aviären Lymphozyten	34
2.2.2.4	Stimulation mit Mitogenen und Wachstumsfaktoren	34
2.2.2.5	Stimulation der PBL Kulturen mit Salmonellen	35
2.2.2.6	Chemotaxis von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	35
2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	36
2.2.3.1	FACS-Analyse der primären aviären Lymphozyten.....	37
2.2.3.2	Auswertung der FACS-Daten	37
2.2.3.3	Durchflusszytometrische Zell-Sortierung	39
2.2.4	Sortierung $\gamma\delta$ T-Zellpopulation mittels magnetischer Beads.....	40
2.2.5	Genexpressionsanalysen	40
2.2.5.1	RNA-Gewinnung aus sortierten Zellen.....	40
2.2.5.2	Quantitative real time RT PCR.....	40
2.2.6	Statistische Analyse	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Optimierung der Kulturbedingungen und Austestung der Stimulierbarkeit von primären aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	42
3.1.1	CD25 Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Wirkstoffen	42
3.1.2	Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Wirkstoffen.....	46
3.1.3	Wirkung von Concanavalin A (ConA) und Phytohaemagglutinin (PHA) auf die auf die CD25 Expression und Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen	48
3.2	Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei einer Salmonella Infektion und Entwicklung von Immunität.....	52
3.2.1.	<i>in-vivo</i> $\gamma\delta$ -T-Zellzahlen im peripheren Blut von immunisierten und nicht-immunisierten Küken und Hennen	52
3.2.2	Expressionsintensitäten von CD8 α , TCR1, und CD25 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes.....	53
3.2.3	<i>Ex-vivo</i> Re-Stimulation von isolierten Lymphozyten des peripheren Blutes	55
3.2.3.1	Definition von neuen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen.....	55
3.2.3.2	CD25-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SEvac-(Re)-Stimulation der PBL	57
3.2.3.3	Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SEvac-(Re)-Stimulation der PBL.....	57
3.2.3.4	Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SEvac-Stimulation der PBL von immunisierten und geboosterten Legehennen	59

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.5 Zytokinexpression der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach SEvac-Re-Stimulation der PBL Kulturen immunisierter und geboosterter Legehennen.....	61
3.3 Funktionelle Analysen der fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SE-Stimulation der PBL von WLA Hühnern	63
3.3.1 Proliferative Aktivität der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SE-Stimulation	63
3.3.2 Dynamik der Antigenexpression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen	64
3.3.2.1 CD25-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen	64
3.3.2.2 MHC-II-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen	66
3.3.2.3 CD44-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen	67
3.3.2.4 Dynamik der CD8 α - und TCR1-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen im Verlauf der Proliferation	69
3.3.3 Migrationsfähigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen.....	69
3.3.4 mRNA-Expressionslevel ausgewählter Zytokine in $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen	71
4. Diskussion.....	75
4.1 Etablierung einer Kultivierungsmethode für aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	75
4.2 Neue $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen mit erhöhter $\gamma\delta$ -TCR-Expression	77
4.3 Dynamik in der CD25-Expression	78
4.4 Mögliche Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen	79
4.4.1 Gedächtnisleistung	80
4.4.2 Mögliche Antigenpräsentation.....	82
4.4.3 Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen aufgrund ihrer Zytokinproduktion.....	84
4.5 Hypothetische Differenzierung von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes	86
4.6 Unterschiede zwischen Hühnerlinien und verschiedenen Altersgruppen	88
4.7 Ausblick.....	90
Literaturverzeichnis.....	91
Abbildungsverzeichnis.....	109
Tabellenverzeichnis.....	110
Anhang.....	111
Selbständigkeitserklärung	114
Danksagung.....	115
Lebenslauf.....	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
ConA	Concanavalin A
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dpb	Tag(e) nach Booster-Immunsierung (<i>days post Booster</i>)
dpi	Tag(e) nach Immunsierung (<i>days post Immunization</i>)
dpS	Tag(e) nach Stimulation (<i>days post Stimulation</i>)
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
IL	Interleukin
KbE	Kolonie bildende Einheit
M	molar
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger Ribonucleinacid</i> (Boten-Ribonucleinsäure)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PHA	Phytohaemagglutinin
PMA	Phorbol-myristat-acetat

Abkürzungsverzeichnis

RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SE	Salmonella Enteritidis
SEvac	Salmonella Enteritidis Lebendimpfstamm
T _A	Annealing Temperatur
Tab.	Tabelle
dpB	Tage nach Booster-Immunsierung (<i>days post booster</i>)
dpl	Tage nach Immunsierung (<i>days post immunization</i>)
T	Tötung
T _s	Schmelztemperatur
TCR	<i>T cell Receptor</i> (T-Zellrezeptor)
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> (Toll-like Rezeptor)

Zusammenfassung

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen beim Huhn den Großteil der T-Zellen im Blut und Organen dar, was auf eine breitere funktionelle Bedeutung in dieser evolutionär älteren Spezies hinweist. Es ist jedoch bisher nur wenig über ihre Aktivierung, Differenzierung und Funktionen bekannt.

Ziel der vorliegenden Studie war die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Fokus auf ihrer Bedeutung bei einer *Salmonella* Enteritidis Infektion. Im ersten Teil der Arbeit sollte ein Zellkultursystem für primäre aviäre Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) etabliert werden um die Zellen in Kultur zu erhalten und zu vermehren. Zweiter und größter Teil der Arbeit umfasste die funktionelle Charakterisierung der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen während einer *Salmonella* Infektion. Eine dritte Fragestellung beschäftigte sich damit, ob Legehennenlinien, die auf hohe Legeleistung selektiert wurden eine geringere Immunkompetenz gegenüber bakteriellen Infektionen aufweisen als ihre nicht auf Legeleistung selektierten Verwandten. Dazu wurden vier Legenhennenlinien mit unterschiedlicher Legeleistung und phylogenetischem Hintergrund verwendet.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurde Lymphozyten aus dem Blut von gesunden Hühnern isoliert und unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden folglich durchflusszytometrisch untersucht. Des Weiteren wurden in einem Tierversuch Eintagsküken gegen *Salmonella* Enteritidis immunisiert und deren $\gamma\delta$ -T-Zellen hinsichtlich einer Gedächtnisleistung anhand ihres Phänotyps, ihrer Proliferation und Zytokintranskription analysiert. Eine detaillierte Untersuchung des Immunphänotyps, der Proliferationsrate und möglicher Differenzierungsvorgänge wurde mittels Durchflusszytometrie unternommen. Die Genexpressionsanalysen der gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen oder sortierter $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen wurden anhand von Real-Time RT-PCRs durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Migrationskapazität und die Fähigkeit zur Antigenpräsentation studiert.

Eine Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen in PBL Kulturen konnte durch die Zugabe von Phorbol-myristat-acetat (PMA) hervorgerufen werden, wobei die Proliferation der Zellen am stärksten nach einer ergänzenden Zugabe von IL-2 ausfiel. IL-2 allein stellte sich als passenden Zusatz für alle weiteren Zellkulturexperimente heraus, da es die Erhaltung und Vermehrung der $\gamma\delta$ -T-Zellen begünstigte.

Im Zuge des Tierversuchs zur Untersuchung der Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach einer Immunisierung gegen *Salmonella* Enteritidis stellte sich erneut die $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation als besonders im Hinblick auf die Bekämpfung der bakteriellen Infektion sowie einer Resistenzentwicklung heraus. Eine Analyse der TCR1- und $CD8\alpha$ -Expression führte zur weiteren Aufteilung der bisherigen drei $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen in fünf neue Populationen: $TCR1^+CD8\alpha^-$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi}\beta^+$, $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ und

Zusammenfassung

TCR1^{hi}CD8α^{hi}. Die TCR1^{hi}CD8α^{lo} und TCR1^{hi}CD8α^{hi} Zellen offenbarten Gedächtnis-ähnliche Eigenschaften aufgrund ihres Anstiegs nach der Immunisierung sowie der erhöhten Proliferation nach *ex vivo* Re-Stimulation. Beide TCR1^{hi} Subpopulationen entstehen womöglich aus den bisher bekannten Subtypen und scheinen einen differenzierteren Phänotyp zu besitzen. Eine umfassende funktionelle Analyse muss jedoch in zukünftigen Untersuchungen fortgesetzt werden.

Die Analysen der Genexpressionsprofile offenbarte eine gemischte T_H1 und T_H17 Polarisierung der CD8α^{hi} Subpopulationen basierend auf ihrer IFN-γ, TNF-α und IL-17 Expression. Zudem zeigten sie eine höhere Proliferations- und Migrationskapazität und eine einzigartige MHC-II Expression, die auf die Fähigkeit zur Antigenpräsentation hinweist. Im Gegensatz dazu wiesen die TCR1⁺CD8α⁻ Zellen die höchste IL-22 Expression unter den γδ-T-Zellen auf. Sie könnten eine eher regulatorische Population sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen eine hohe funktionelle Heterogenität innerhalb der γδ-T-Zellen. Die Daten stimmen mit Erkenntnissen aus dem Schwein und Rind überein, die den γδ-T-Zellen ein weites Spektrum an Funktionen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems zuschreiben.

Die Annahme, dass eine Selektion auf hohe Legeleistung einen negativen Einfluss auf die Immunkompetenz der Legehennen hat, konnte mittels vorliegender Studie nicht bestätigt werden. Alle durchgeführten Experimente ergaben keine oder kaum signifikanten Unterschiede in der γδ-T-Zellantwort zwischen Hoch- oder Niedrigleistungshühnern. Währenddessen scheint der phylogenetische Hintergrund von größerer Bedeutung zu sein, da die meisten Unterschiede zwischen weißen und braunen Legern gefunden wurden.

Summary

In chickens, $\gamma\delta$ T cells are frequently found in blood and organs indicating a broader functional importance of these cells in evolutionary older species. Avian $\gamma\delta$ T cells are still an enigmatic cell population not only regarding their functions but also their activation and differentiation.

Aim of the study was the phenotypical and functional characterization of avian $\gamma\delta$ T cells especially in the context of a *Salmonella* Enteritidis infection. First part of the presented study dealt with the establishment of a suitable peripheral blood lymphocyte (PBL) culture systems and stimulation regime to maintain and expand avian primary $\gamma\delta$ T cells. Secondly, investigations on $\gamma\delta$ T-cell functions focused on their role during a *Salmonella* infection. The third part of the study aimed to examine the immune competence with special interest in $\gamma\delta$ T cells of chicken lines varying in egg laying performance and phylogenetic background. The question arose if selection for high egg laying performance have had a negative impact on the immune response to bacterial infections.

To answer these questions, lymphocytes from peripheral blood of healthy chickens were isolated and cultured $\gamma\delta$ T cells were analysed by flow cytometry. Furthermore, day-old chicks were immunized against *Salmonella* Enteritidis (SEvac) and $\gamma\delta$ T cells were analysed in terms of a memory function by antigen expression, recall proliferation and cytokine transcription. A detailed analysis of the immunophenotype, the proliferative activity and possible differentiation was performed via flow cytometry. Gene expression profiles of whole $\gamma\delta$ T cells or sorted $\gamma\delta$ T-cell subsets was explored by real time RT-PCR. Moreover, migratory capacity as well as the ability of antigen presentation were studied.

Activation of $\gamma\delta$ T cells from PBL cultures was strongly induced by Phorbol-myristate-acetate (PMA) whereby proliferation was most pronounced after addition of IL-2. IL-2 alone however turned out to be a good cell culture supplement to maintain and expand all $\gamma\delta$ T-cell subsets in PBL cultures.

As result of the animal trial investigating $\gamma\delta$ T-cell subsets after *Salmonella* Enteritidis vaccination, $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ T cells turned out to possess a pivotal function during bacterial clearance and infection resistance. Analysis of the TCR1- and $CD8\alpha$ -expression led to a further subdivision of established subsets into five new $\gamma\delta$ T-cell subsets: $TCR1^+CD8\alpha^-$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta^+}$, $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ and $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$. $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ and $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ cells were assumed to have memory-like properties due to their increase after vaccination and stronger recall proliferation after *ex-vivo* re-stimulation. Both $TCR1^{hi+}$ subsets might arise from the classically described populations and be constituted of more differentiated cells. However, a comprehensive functional study has to be undertaken in future experiments.

Summary

Cytokine expression analysis revealed a mixed T_H1 and T_H17 polarization of $CD8\alpha^{hi}$ $\gamma\delta$ T-cell subsets based on their IFN- γ , TNF- α and IL-17 expression. Moreover, they showed a stronger proliferative and migratory capacity and a unique MHC-II expression which implicates an ability for antigen presentation. In contrast, $TCR1^+CD8\alpha^-$ cells showed highest IL-22 expression amongst $\gamma\delta$ T-cell subsets and may be a more regulatory subset.

Results of the study point to a high functional heterogeneity of the $\gamma\delta$ T-cell subsets. Data is in line with studies from cattle and pig which propose a broad functional spectrum of $\gamma\delta$ T cells covering innate and especially adaptive immune cell functions.

The assumption that a selection for high egg laying performance have had a negative impact on the immune competence of laying hens could not be confirmed. Results of all performed experiments hardly revealed a significant difference regarding the $\gamma\delta$ T-cell response between high or low performing layer lines. Thus, the phylogenetic difference seems to be of greater impact as most variations were found between white and brown chickens.

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die Lymphozyten der erworbenen Immunität umfassen funktionell spezialisierte Zellpopulationen, die auf verschiedene Weise zur Wirtsabwehr gegen ein breites Pathogenspektrum beitragen. Neben den sich im Knochenmark entwickelnden B-Lymphozyten existiert eine zweite Linie von spezifischen Effektorzellen. Die T-Lymphozyten der Säuger und Vögel reifen im Thymus heran und exprimieren einen heterodimeren Glykoproteinrezeptor (T-cell receptor; TCR) bestehend aus einer α - und β - bzw. einer γ - und δ - Kette. Trotz vieler Gemeinsamkeiten mit den $\alpha\beta$ -T-Zellen besitzen $\gamma\delta$ -T-Zellen eine andere Gewebsverteilung und einzigartige Eigenschaften und Funktionen (Hayday, 2000; Holtmeier und Kabelitz, 2005; Vantourout und Hayday, 2013).

1.2 Vergleich zu $\alpha\beta$ -T-Zellen

Untersuchungen in der Maus und beim Mensch zeigen, dass sowohl $\alpha\beta$ - als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen einer gemeinsamen CD4/CD8 negativen Vorläuferzelle im Thymus entstammen (Hayes und Love, 2007; Lauritsen et al., 2008; Turchinovich und Pennington, 2011; Prinz et al., 2013; Zarin et al., 2015). Im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung differenzieren sich $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen in Wellen, wobei die $\gamma\delta$ -T-Zellen zuerst entstehen und in periphere Gewebe auswandern (Carding et al., 1990; Carding und Egan, 2002). Die $\alpha\beta$ -T-Zellen besiedeln vorrangig sekundäre lymphatische Organe und machen den Großteil der T-Zellen im peripheren Blut aus, wohingegen $\gamma\delta$ -T-Zellen vorrangig in Epithelien wie Haut, Lunge, Darm- und Fortpflanzungstrakt zu finden sind, (Hayday und Viney, 2000; Chien et al., 2014). Beide Zelltypen sind hoch konserviert und entwickelten sich bereits vor 400-500 Mio. Jahren bei den ersten kieferhaften Vertebraten (Holderness et al., 2013). Ihr Anteil innerhalb der peripheren Lymphozyten variiert jedoch stark zwischen verschiedenen Spezies. Während bei Mensch und Maus nur etwa 0,5 – 10 % der peripheren Lymphozyten $\gamma\delta$ -T-Zellen sind, nehmen sie bei domestizierten Tierarten wie Huhn, Schwein und Rind einen deutlich höheren Anteil von bis zu 50 % ein (Chien et al., 2014; Holderness et al., 2014), der auf ein breiteres funktionelles Spektrum der $\gamma\delta$ -T-Zellen in diesen phylogenetisch älteren Spezies hinweist.

Sowohl $\alpha\beta$ - als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren einen T-Zell-Rezeptorkomplex bestehend aus TCR und CD3. Dennoch binden $\gamma\delta$ -T-Zellen der Säuger unprozessierte und nicht mit Hilfe von MHC-Molekülen

1. Einleitung

präsentierte Antigene und sind damit nicht abhängig von der Expression der Co-Rezeptoren CD4 und CD8 (Hayday et al, 2000; Kabelitz et al., 2000; Chien und Konigshofer, 2007; Kabelitz und He, 2012). Des Weiteren üben sie im Gegensatz zu den meisten $\alpha\beta$ -T-Zellen Funktionen in der Immunüberwachung und Stresserkennung aus. Damit leisten $\gamma\delta$ -T-Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Wundheilung, Erhaltung der Gewebshomöostase und der Regulation von Immunreaktionen.

1.3 Stellung der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem wird anhand verschiedener Kriterien klar in einen angeborenen und einen erworbenen Teil unterteilt (Abb. 1). Die angeborene Immunität ist gekennzeichnet durch eine frühe, lokale und kurzzeitige Immunantwort vermittelt durch Granulozyten, Makrophagen und Zytokine (Spiering, 2015). Das adaptive oder erworbene Immunsystem ist hingegen dadurch charakterisiert, dass dessen Zellen zu einer spezifischen Immunantwort und der Ausbildung von spezialisierten Effektor- und Gedächtniszellen in der Lage sind (Dempsey et al., 2003; Schenten und Medzhitov, 2011). $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen Rezeptoren aus beiden Teilen des Immunsystems. Neben dem T-Zell-Rezeptor exprimieren sie eine Reihe weiterer Rezeptoren, die normalerweise Zellen des angeborenen Immunsystems zugeordnet sind. Darunter befinden sich Rezeptoren von natürlichen Killer-Zellen (NKRs), *Scavenger-receptor cystein-rich domain receptors* (SRCR), *NOD-like* Rezeptoren und *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) (Wesch et al., 2011). Diese dienen der Erkennung molekularer Muster von verschiedensten Mikroorganismen. Es ist bekannt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen in Folge viraler, bakterieller sowie parasitärer Infektionen aktiviert werden und expandieren (Kano et al., 2009; Pieper et al., 2011). Daraufhin sind sie dazu in der Lage, spezifische Effektorfunktionen wie Zytokinsekretion und Zytotoxizität auszuüben. Des Weiteren sind sie zur Erkennung körpereigener Antigene in der Lage, was eine Unterscheidung zwischen dem Selbst und dem Nicht-selbst erlaubt und sind somit in eine Reihe von Autoimmunerkrankungen involviert (Thedreuz et al., 2007; Hayday, 2009). Sowohl Rae-1 und H60 Proteine in der Maus als auch MICA, MICB und ULBPs beim Mensch werden durch den NKG2D Rezeptor von vielen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen dieser Spezies erkannt (Carding und Egan, 2002; Girardi, 2006; Vantourout und Hayday, 2013). Man nimmt zudem an, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen durch die Expression von weiteren vielfältigen Rezeptoren einzigartige und zwischen Spezies konservierte regulatorische Funktionen bei der Erhaltung der Gewebshomöostase, Wundheilung und der Beseitigung von gestressten sowie Tumorzellen übernehmen (Holderness et al., 2013; Kaylan und Kabelitz, 2013; Chien et al., 2014). Aufgrund dieser diversen Funktionen werden $\gamma\delta$ -T-Zellen oft als unkonventionelle T-Zellen bezeichnet, die eine Brückenstellung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem einnehmen (Beetz et al., 2008; Hayday, 2000; Kabelitz et al., 2013).

1. Einleitung

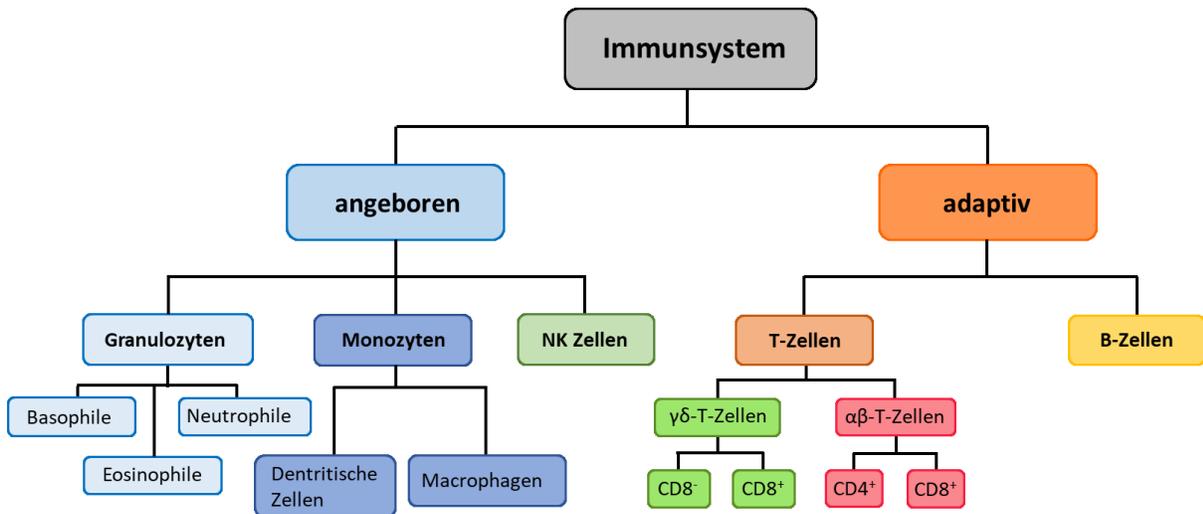


Abb. 1: Stellung der $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb des Immunsystems. Aufgrund ihrer Eigenschaften nehmen sie häufig in der Literatur gemeinsam mit den natürlichen Killerzellen (NK Zellen) eine „Brückenfunktion“ zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem ein (hier in grünen Farbtönen dargestellt).

1.4 Funktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Da $\gamma\delta$ -T-Zellen vorwiegend in mucosalen Epithelgeweben auftreten und dort den Entzündungsprozess initiieren und die Rekrutierung der Zellen des angeborenen Immunsystems vorantreiben, wurden sie lange Zeit als Zellen des angeborenen Immunsystems klassifiziert (Born et al., 2006; Beetz et al., 2008; Ferreira, 2013). Jedoch ist die Annahme, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen angeborene Immunzellen mit einem limitierten funktionellen Potenzial sind, überholt (Holderness et al., 2013; Chien et al., 2014). Obgleich $\gamma\delta$ -T-Zellen viele Funktionen mit konventionellen $\alpha\beta$ -T-Zellen gemeinsam haben (Lombes et al., 2015), weist ihre konservierte Existenz bei allen untersuchten Wirbeltierspezies auf eine wichtige und nicht redundante Funktion innerhalb des Immunsystems hin.

Bei $\alpha\beta$ -T-Zellen erfolgt klassischerweise eine Einteilung in einen T_{Helfer} -Typ 1 oder -Typ 2. Zellen des Typ 1 sekretieren vorrangig IFN- γ und IL-2 und tragen damit zur Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunantwort bei. Zellen des Typ 2 exprimieren hingegen vorrangig Interleukin-4 (IL-4), welches B-Zellen und damit die Antikörper-vermittelte Immunantwort aktiviert (Del Prete et al., 1998; Romagnani, 1999). $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Mensch, Maus, Rind und Schwein weisen vorwiegend eine Typ-1-Polarisation durch die Produktion von IFN- γ auf (Garcia et al., 1997; Traxlmayer et al., 2010; Paul et al., 2014). Neben dieser Einteilung haben sich in den letzten Jahren weitere T-Zelltypen etabliert, unter denen sich auch $\gamma\delta$ -T-Zellen verschiedener Spezies einordnen lassen. T_{H} 17- und T_{H} 22-Zellen zeichnen sich zum Beispiel durch eine

1. Einleitung

ausgeprägte Expression von IL-17, IL-21 und IL-22 aus und initiieren eine angeborene Immunreaktion in Epithelzellen. Während IL-17 proinflammatorisch wirkt und in eine Reihe von Autoimmunerkrankungen involviert ist, fungiert IL-22 eher schützend und regenerierend auf Epithelzellen (Eyerich et al., 2010; Isailovic et al., 2015).

Neben der Bildung von spezifischen Zytokinen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen dazu in der Lage, infizierte oder auch mutierte Zellen gezielt über den Fas-FasL Signalweg oder durch Sekretion von Granzym zu töten (Qin et al., 2009; Li und Panza, 2010). Dadurch leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Tumorbekämpfung (Kabelitz et al., 2013; Wu et al., 2014). Des Weiteren hat sich die Funktion als Gedächtniszellen bei $\gamma\delta$ -T-Zellen von Säugern in den letzten Jahren stark etabliert (Sheridan et al., 2013; Hartwig et al., 2015; Lalor und McLoughlin, 2016; Lauvau et al., 2016).

Neben diesen klassischen T-Zell-Eigenschaften erfüllen sie beachtliche Funktionen bei der Initiierung und Regulation der Immunantwort (Kühl et al., 2009). Ihre Residenz in Epithelgeweben unterstützt die Hypothese, dass sie als erste Abwehrlinie gegen Pathogene fungieren. Durch ihre pro-inflammatorische Wirkung induzieren sie die Rekrutierung von Makrophagen und Granulozyten und tragen zur Reifung von antigen-präsentierenden Zellen (APCs) bei (Baldwin et al., 2015). Des Weiteren sind sie selbst in der Lage Antigene zu präsentieren und co-stimulatorische Effekte auf $\alpha\beta$ -T-Zellen auszuüben (Brandes et al., 2005, 2009; Moser und Eberl, 2007). Gleichzeitig sind sie zu einer selektiven Expansion in der Lage und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr (Thielke et al., 2003). Im weiteren Verlauf der Immunreaktion erfüllen sie beachtliche Aufgaben bei der Regulation der Immunantwort und der Wiederherstellung der Gewebemöostase sowie der Wundheilung (Kabelitz et al., 2013; Prinz et al., 2013; Vantourout und Hayday, 2013). Zusammenfassend lassen sich für die $\gamma\delta$ -T-Zellen typische Effektorfunktionen von Zellen der angeborenen sowie der adaptiven Immunität und immunregulatorische Funktionen in Entzündungs- und Wundheilungsprozessen, aber auch bei der Induktion von Immuntoleranz belegen. Die unzähligen nachgewiesenen Funktionen sind teilweise gegensätzlich oder beruhen häufig nur auf der Untersuchung einzelner Subpopulationen von einer Spezies.

1.5 $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen

Funktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen sind jeweils nur für bestimmte Subpopulationen bekannt. Diese werden nach verschiedenen Kriterien unterschieden. Unter anderem anhand spezifischer Phänotypen, dem TCR Gensegmentgebrauch oder auch nach ihrer Verteilung in verschiedene Gewebe (Turchinovich und Pennington, 2012; Pang et al., 2012; Chien et al., 2014). Die Einteilung in Subpopulationen wird jedoch bei jeder Spezies anhand anderer Kriterien vorgenommen, was eine Generalisierung von Populationen und

1. Einleitung

deren Funktionen unmöglich macht. Humane $\gamma\delta$ -T-Zellen kommen vor allem in Epithelgeweben vor und werden aufgrund zweier möglicher variabler Regionen der TCR- δ -Untereinheit in $V\delta 1^+$ oder $V\delta 2^+$ Zellen unterteilt (Pang et al., 2012). Der Großteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen des Menschen exprimiert $V\gamma 2$ und $V\delta 2$ Ketten (nach alternativer Nomenklatur $V\delta 9$) (Kabelitz et al., 2012; Kalyan und Kabelitz, 2013). Diese Zellen sind gleichzeitig am umfassendsten erforscht und weisen ein sehr breites funktionelles Spektrum auf. Sie produzieren ein breites Repertoire an Zytokinen, sind stark zytotoxisch, regulieren die Immunantwort der $\alpha\beta$ -T-Zellen und sind zur Antigen-Präsentation befähigt (Kabelitz und He, 2012).

In der Maus ist es üblich Subpopulationen aufgrund der variablen $V\gamma$ -Kette des T-Zellrezeptors zu definieren, aber auch mit Hilfe verschiedener Oberflächenmarker wie z.B. CD25, CD27, CD44 und CD122 sowie ihrer unterschiedlichen Gewebsverteilung (Pang et al., 2012; Dong et al. 2014). Diese Subpopulationen unterscheiden sich zumeist durch eine andere Zytokinproduktion. $V\gamma 5V\delta 1^+$ dendritische epidermale T Zellen der Maus sind umfassend beschrieben und werden der angeborenen Immunität zugeordnet (Nanno et al., 2007). Sie exprimieren zudem CD44, CD103 und CD122, und sind CD62L negativ. Nach Aktivierung produzieren sie $IFN-\gamma$, sind jedoch auch dazu in der Lage $IL-13$ vermittelte T_H2 Antworten zu induzieren. Im Gegensatz dazu sind $V\gamma 6V\delta 1^+$ Zellen der Haut $CD25^+CD44^+CD122^-$ und gelten als angeborene Haupt- $IL-17$ -Produzenten, die dadurch in eine Reihe entzündlicher Prozesse involviert sind (Cua und Tato, 2010, Do et al., 2010; Sutton et al., 2012; Colpitts et al, 2015).

Hühner und andere domestizierte Spezies wie Rind und Schwein weisen einen deutlich höheren Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut auf als Mensch und Maus (Holderness et al., 2013). Obwohl die vermehrte Anzahl dieser Zellen in den phylogenetisch älteren Spezies auf ein breiteres Funktionsspektrum hinweist, sind sie kaum erforscht. Porcine $\gamma\delta$ -T-Zellen werden traditionell nach ihrer CD2, CD4 und CD8 Expression in Subpopulationen unterteilt, da nur wenige weitere Oberflächenmarker auf diesen Zellen nachweisbar sind (Saalmüller et al., 1990; Reddehase et al., 1991; Gerner et al., 2009). Diese sind weiterhin durch unterschiedliche Zytokinprofile charakterisiert (Sedlak et al., 2014). Auf $CD8^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen des Schweins wurde bereits MHC-II detektiert, was eine Antigen-präsentierende Funktion dieser Zellen nahelegt (Takamatsu et al., 2006; Gerner et al., 2009; Sedlak et al., 2014).

Bovine $\gamma\delta$ T-Zellen werden anhand der zusätzlichen Expression des *Workshop-Cluster 1* (WC1) Rezeptors und dessen verschiedenen Ausprägungsformen unterschieden. Zur weiteren Charakterisierung werden ähnlich wie beim Schwein zudem Co-Rezeptoren wie CD2, CD4 und CD8 herangezogen. Am besten untersucht sind $WC1.1^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen, die gleichzeitig den größten Anteil beim Rind ausmachen. Sowohl $WC1.1^+$ als auch $WC1.2^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen des Rinds haben regulatorische Funktionen (Rhodes et al., 2001; Guzman et al., 2012). Verschiedene Studien konnten zudem eine Gedächtnisfunktion nachweisen (Naiman

1. Einleitung

et al., 2002; Blumerman et al., 2007; Alvarez et al., 2009). Des Weiteren agieren sie als Killer-Zellen und sind zur Antigenpräsentation in der Lage (Toka et al., 2011; Guzman et al., 2012; Collins et al., 1998).

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

Der Beitrag der $\gamma\delta$ -T-Zellen zur Immunabwehr ist nicht allein abhängig von ihrer Anzahl, sondern viel mehr von ihrer Aktivierung und der Differenzierung in kompetente Effektor- oder Gedächtniszellen. Die Aktivierung humaner $V\gamma9V\delta2$ -T-Zellen durch kleine Pyrophosphatantigene ist unlängst bekannt (Beetz et al., 2008; Li und Panza, 2010). Die TCR-vermittelte Aktivierung und Phosphorylierung von nachgeschalteten *mitogen-activated protein* (MAP) Kinasen und *extracellular signal-regulated* Kinasen (ERK1/2) leiten das Signal weiter. Schließlich führt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), AP-1 und NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) zu einer Änderung der Genexpression und damit zur Zellteilung und Differenzierung (Szamel und Resch, 1994; Isakov und Altman, 2013). Für humane $\gamma\delta$ -T-Zellen am besten untersucht ist die Bindung des Isopentenylpyrophosphats (IPP), welches von verschiedensten Bakterien gebildet wird und dem 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat (HMBPP), welches speziell von Krebszellen ausgeschiedenen und als Tumor-assoziiertes Antigen von $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt wird (Jameson et al., 2010; Wang et al., 2011).

Eine Aktivierung der genannten Phosphat-Tyrosin-Kinasen (PTK) ist auch durch unspezifisch bindende Molekülverbindungen oder sekundäre Pflanzenstoffe induzierbar. Ein in der Immunologie weit verbreitetes Mitogen ist das Phorbol-myristat-acetat (PMA). Aufgrund seiner geringen Molekülgröße ist es in der Lage frei in die Zelle hinein zu diffundieren. Dort imitiert es durch seine hohe Ähnlichkeit das Diacylglycerat und induziert damit eine Aktivierung der Phospholipase C, die dem T-Zell-Rezeptor nachgeschaltet ist. Folglich kommt es zu einer Aktivierung der Protein Kinase C und der fortlaufenden Phosphorylierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalkaskade, die letztlich eine Änderung der Genexpression hervorruft (Isakov und Altman, 2012). Üblicherweise wird PMA in Kombination mit dem Calcium Ionophor Ionomycin verwendet um den Calcium-Influx innerhalb der Zelle zu stimulieren, der wiederum für die Funktion der Protein Kinase C essentiell ist (Isakov und Altman, 2013). Darüber hinaus bekannte T-Zellstimulanzen sind Concanavalin (ConA) und Phytohaemagglutinin (PHA), die zur Gruppe der Lectinen gehören (Fairhurst et al., 1993). Diese sind vor allem von Leguminosen gebildete sekundäre Pflanzenstoffe, deren proliferationsfördernde Wirkung auf verschiedenen Zelltypen bekannt ist. Sie wirken ähnlich dem PMA auf die Kinasesignalwege der Zelle, wobei der genaue Wirkmechanismus beider Stimulanzen nicht vollständig bekannt ist.

1. Einleitung

Nichtsdestotrotz konnte eine Aktivierung, die Induktion der Proliferation und IFN- γ Produktion *in-vitro* durch eine PMA/ Ionomycin, PHA oder ConA Stimulation für bovine $\gamma\delta$ -T-Zellen gezeigt werden (Quade und Roth, 1999; Sathiyaseelan and Baldwin, 2000; Baldwin et al., 2002; Fikri et al., 2002). Für porcine $\gamma\delta$ -T-Zellen ist ebenfalls eine Induktion der Proliferation durch ConA und IL-2 bewiesen (Sedlak et al., 2014). $\gamma\delta$ -T-Zellen beider Spezies konnten so bereits in PBMC-Kulturen oder in reinen $\gamma\delta$ -T-Zellkulturen erfolgreich am Leben erhalten, aktiviert, vermehrt und studiert werden.

Beim Huhn gab es bislang nur Ergebnisse zur Kultur von Leukozyten der Milz, bei welchen mit Hilfe von ConA erfolgreich Proliferation induziert werden konnte (Hanieh et al., 2012; Ren et al., 2015; Yu et al., 2015). Zudem wurde eine Proliferationsaktivierung aviärer gesamt T-Zellen durch PHA beschrieben (Theis et al., 1975; Yu et al., 2013). Trotzdem gelten aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen als sehr schlecht durch Mitogene stimulierbar. Es wird vermutet, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen in ihrem Überleben stark von Zytokinen abhängen, die von CD4⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen gebildet werden (Kasahara et al., 1993; Choi und Lillehoj, 2000).

Neben aktivierenden oder als Antigen fungierenden Molekülverbindungen sind aber vor allem körpereigene Wachstumshormone (Zytokine) für die Zellteilung und -Differenzierung verantwortlich. Neben Interleukin 7 (IL-7) und Interleukin-15 (IL-15) ist Interleukin-2 (IL-2) das wohl bekannteste wachstumsfördernde Zytokin, dessen Wirkung auf Lymphozyten vielfach beschrieben ist (Gaffen und Liu, 2004; Lan et al., 2008). Vorwiegend von CD4⁺ T-Helfer Zellen produziert ist es dazu in der Lage die Proliferation von verschiedenen Effektorzellen anzuregen, die Antikörperproduktion von B-Zellen zu fördern und zytotoxische Aktivität zu steigern (Liao et al., 2013). Der IL-2-Rezeptor ist aus drei verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Neben der für die IL-2-Bindung spezifische β -Kette des Rezeptors (CD122) ist die γ -Kette (CD132) in zahlreichen anderen Rezeptoren der Typ-1 Zytokinrezeptoren zu finden. Die α -Kette des Rezeptors (CD25) ist für die Bindung von IL-2 spezifisch und erhöht zudem die Bindungsaffinität des Rezeptors um das 1000-fache (Teng et al., 2006). Nach der Bindung von IL-2 wird der gesamte Rezeptor internalisiert und gekoppelte Phosphotyrosinkinase aktiviert. Diese schalten die MAP-Kinasekaskade, die Janus-Kinase und *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) Proteine und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) an. Diese Signaltransduktionswege führen alle zu einer veränderten Transkription verschiedener Gene und damit zur Zellproliferation (Minami et al., 1993; Bayer, 2013; Isakov und Altman, 2012).

1.7 Aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen

Wie Säugetiere besitzen auch Vögel sowohl $\alpha\beta$ -T-Zellen als $\gamma\delta$ -T-Zellen. Auch hier entwickeln sich beide Zelltypen in Wellen, wobei $\gamma\delta$ -T-Zellen etwas früher erscheinen (Chen et al., 1988; Sowder et al., 1988;

1. Einleitung

Dunon et al., 1997). Nach ihrer Reifung im Thymus wandern $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Huhn vorrangig in die Milz und den Darm aus. Vor allem bei sehr jungen Tieren ist eine stark ausgeprägte Lokalisation in der intestinalen Lamina propria zu beobachten. Im Vergleich zu Mensch und Maus besitzen Hühner einen sehr hohen Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut, der bis zu 50 % der lymphoiden Zellen betragen kann (Arstila und Lassila, 1993).

Subpopulationen von Hühner $\gamma\delta$ -T-Zellen werden wie auch in anderen Spezies nach der Expression weiterer Oberflächenantigene eingeteilt. Während $\alpha\beta$ -T-Zellen des Huhns entweder CD4 oder CD8 exprimieren, sind $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Regel CD4 negativ. Ein kleiner Anteil weist hingegen die Expression des CD8 Co-Rezeptors auf, anhand dessen sie in Subpopulationen eingeteilt werden können. Es werden CD8 α negative (CD8 α ⁻), CD8 α schwach positive (CD8 α ^{dim+}) und CD8 α stark positive (CD8 α ^{hi+}) $\gamma\delta$ -T-Zellen unterschieden (Tregaskes et al., 1995; Luthala, 1998; Berndt et al., 2006). Die CD8 α ^{hi+} Population kann weiter anhand des Auftretens des CD8 $\alpha\alpha$ homodimeren oder CD8 $\alpha\beta$ heterodimeren Rezeptors unterschieden werden (Berndt et al., 2006; Pieper et al., 2008). $\gamma\delta$ -T-Zellen der Milz weisen zudem eine CD28 Expression auf (Berndt et al., 2006).

Eine detailliertere phänotypische Charakterisierung aviärer $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ist noch immer durch das Fehlen spezifischer Antikörper gegen einer Vielzahl aviärer Antigene stark eingeschränkt. Aus Untersuchungen der Genexpression im Huhn ist mehr über die $\gamma\delta$ -T-Zellen bekannt. Es wurde bereits gezeigt, dass auch aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen maßgebliche IFN- γ Produzenten während einer *Salmonella*-Infektionen sind (Matulova et al., 2012; Pieper et al., 2008). Zudem wurde ihnen bereits die Sekretion von IL-17 und IL-22 nachgewiesen, die sie mit den „innate-like“ $\gamma\delta$ -T-Zellen der Haut von Mäusen gemeinsam haben (Matulova et al., 2012).

Am besten untersucht sind bisher CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen, die durch ihren starken Anstieg im Darm und im Blut und der Produktion von IFN- γ eine tragende Rolle bei der *Salmonella* Abwehr im Darm zu spielen scheinen (Berndt et al., 2006; Pieper et al., 2008; Pieper et al., 2011). Des Weiteren ist ein zytotoxisches Potenzial durch die Expression von Fas und FasL wahrscheinlich (Pieper et al., 2011). Die meisten Studien zu $\gamma\delta$ -T-Zellen beziehen sich auf die Geschehnisse während einer *Salmonella*-Infektion und unterscheiden nicht zwischen Subpopulationen. Aus Studien mit Vollblut-Stimulation ist bekannt, dass vor allem CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen durch *S. Enteritidis* ihre CD25 Oberflächenexpression stark hoch regulieren, was auf eine Aktivierung dieser Zellen hindeutet (Braukamann et al., 2015). Trotz steigendem Interesse der Forschung und vermehrter Untersuchungen ist das funktionelle Spektrum aviärer $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen noch weitestgehend unbekannt.

1. Einleitung

2. Salmonellen

2.1 Einteilung und Bedeutung der Salmonellen

Salmonellen sind Gram-negative stäbchenförmige, meist peritrich begeißelte Bakterien der Familie der Enterobacteriaceae. Diese normalerweise extrazellulären Bakterien können auch fakultativ intrazellulär und unter anaeroben Bedingungen überleben. Innerhalb der Art *Salmonella enterica* sind 2500 verschiedene Serovare beschrieben, die sich weiter in wirtsadaptierte Serovare wie z.B. Typhi beim Mensch, Gallinarum beim Geflügel, Dublin beim Rind und Choleraesuis beim Schwein einteilen. Neben diesen existieren des Weiteren nicht wirtsadaptierte Serovare wie Infantis, Hadar, Enteritidis und Typhimurium. Die beiden virulentesten Serovare Enteritidis und Typhimurium können bei verschiedenen Wirtsspezies sowohl enterale als auch systemische Infektionen hervorrufen. *S. enterica* Serovar Enteritidis und Typhimurium sind nach wie vor weltweit die Hauptursache für Gastroenteritidis des Menschen, hauptsächlich ausgelöst durch den Verzehr von kontaminierten Geflügelprodukten wie Eiern, Eierzeugnissen und Geflügelfleisch (Okamura et al., 2004; Howard et al., 2012; Bai et al., 2014). Im Jahr 2017 meldete das Robert-Koch-Institut 3675 Salmonella Erkrankungen in Deutschland (https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2017.pdf?__blob=publicationFile).

Hühnerküken reagieren am empfindlichsten auf eine Infektion, da das adaptive Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist. Nach 3 – 5 Tagen Inkubation zeigen sie Symptome wie Mattigkeit, Fieber, gesträubtes Gefieder, Hängenlassen der Flügel, geringe Fresslust, Durstgefühl und Durchfall (Methner, 2005). Diese Infektionen von sehr jungen Tieren sind häufig mit einer hohen Mortalität verbunden, können aber auch chronisch verlaufen, was zur dauerhaften Keimausscheidung führt. Ältere Tiere hingegen erkranken nur sehr selten und wenn, dann bleiben Infektionen meist ohne Symptome (Barrow et al., 1988; Beal et al., 2004; Jawale et al., 2014). Diese Tiere können ihr Leben lang in einem sogenannten „Carrier State“ verbleiben und die Keime in die Nahrungskette einbringen (Chappell et al., 2009; Johnston et al., 2012; Wigley, 2013, 2014). Deshalb ist die Kontrolle von *Salmonella*-Infektionen in der Geflügelzucht und Eierproduktion eine wesentliche Problematik um Infektionen beim Mensch einzudämmen. In den letzten Jahren ist die Infektionsrate in Großställen stark zurückgegangen, u. a. wegen verbesserter Hygienestandards, besserer Tierhaltungsbedingungen und Impfungen (<https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/salmonella>). Ziel der Impfungen ist es, die Kolonisation des Darms zu verhindern, wodurch es folglich weniger zur Keimausscheidung und zur Kontaminierung der Eier kommt. Zum anderen soll eine systemische Infektion verhindert werden, bei der normalerweise auch die Reproduktionsorgane betroffen sind. Es sind inzwischen verschiedene *Salmonella*-lebensstadien als auch

1. Einleitung

Inaktivimpfstoffe gegen Typhimurium und Enteritidis erhältlich, die bei Elterntieren der Mast- und Legehaltung, sowie bei Legehennen während der Aufzucht Anwendung finden. Es hat sich gezeigt, dass die Immunisierung mit lebend- bzw. abgetöteten Impfstämmen zu einem unterschiedlichen Grad der Immunität führt. So wurde bereits nachgewiesen, dass abgetötete Impfstoffe zwar eine starke Immunantwort auslösen, aber nur zu einem geringen Schutz vor einer erneuten Infektion führen (Cooper et al., 1993; Withanage et al., 2005). Attenuierte Lebendimpfstoffe hingegen zeigten einen höheren Immunschutz gegen eine erneute Wildtyp-Infektion (Hassan und Curtiss, 1996; Berndt et al., 2001; Babu et al., 2003; Filho et al., 2012). Zur Weiterentwicklung der Impfstrategien ist jedoch ein besseres Verständnis der beteiligten Immunzellen und deren Zusammenspiel bei der *Salmonella* Abwehr von Nöten.

2.2 Interaktion von Salmonellen mit dem Immunsystem und die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen

Der Infektionsweg beim Huhn verläuft meist oral. Die Salmonellen können daraufhin den Darm besiedeln und je nach Invasivität und Serovar in tiefere Schichten der intestinalen Lamina propria oder sogar in andere Organe eindringen (Berndt et al., 2007; Tam et al., 2008; Jantsch et al., 2011). Nach der Invasion von nicht-wirtsadaptierten Serovaren in die intestinale Mucosa kommt es beim Huhn wie beim Säuger zu einer Entzündungsreaktion, die durch einen Einstrom von Heterophilen und Makrophagen charakterisiert ist (Nanno et al., 2007; Van Hemert et al., 2007; Chappell et al., 2009; Rychlik et al., 2014). Früher nahm man an, dass die humorale Immunantwort, vor allem durch Antikörper der Klasse IgG und IgA für eine Klärung der Infektion essentiell sind. Studien mit bursectomierten Tieren stellten die funktionelle Bedeutung der Immunglobuline jedoch in Frage und inzwischen weiß man, dass die T-Zell vermittelte Immunantwort beim Huhn genau wie beim Säuger eine wichtigere Rolle einnimmt (Van Immerseel et al., 2002; Beal et al., 2006; Sekelova et al., 2017). $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen dabei von besonderer Bedeutung zu sein, wie das Einwandern dieser Lymphozyten in das Darmepithel von Mensch, Rind, Maus und Huhn zeigt (Hara et al., 1992; Mixer et al., 1994; Berndt et al., 2007; Gerner et al., 2009). Diese Zunahme legt eine tragende Rolle dieser Zellen bei der Immunantwort gegenüber einer *Salmonella*-Infektion nahe. Ihre spezifische Funktion ist jedoch speziell beim Huhn noch weitestgehend unbekannt. Frühere Studien zeigten, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen im Darm große Mengen IFN- γ produzieren und somit eine T_{Helfer} Typ-1 vermittelte Immunantwort induzieren. Daraufhin kommt es zum Einstrom von Makrophagen und $\alpha\beta$ -T-Zellen (Pieper et al., 2008, 2011). Ob $\gamma\delta$ -T-Zellen selbst zur Bekämpfung der Bakterien und Tötung Bakterien-infizierter Zellen in der Lage sind und welche weiteren immunologischen Funktionen sie während einer *Salmonella*-Infektion übernehmen, bleibt zu klären.

1. Einleitung

3. Vergleich von Legehennen Linien

Eine weitere zentrale Fragestellung des übergeordneten Projektes ist, ob und in wie weit sich auf eine hohe Leistungseffizienz selektierte Hühner in ihrer Anpassungsfähigkeit gegenüber verschiedenen Faktoren von nicht auf Leistungseffizienz selektierten Hühnern unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunkompetenz der verschiedenen Hühner verglichen. Aus voran gegangenen Studien ist bereits bekannt, dass sich die Komposition der Immunzellen, insbesondere der $\gamma\delta$ -T-Zellen, im Blut zwischen den Hühnerlinien unterscheidet.

Unterschiede in der Immunkompetenz zwischen verschiedenen Rassen, Altersgruppen und Zuchtlinien verschiedener Nutztiere wurden mehrfach nachgewiesen. Bei Legehennen wurden beispielsweise Hinweise gefunden, dass die Selektion auf hohe Legeleistung ihre Anpassungsfähigkeit gegenüber Herausforderungen der Umwelt reduziert haben könnte (Väisänen und Jensen, 2004; Väisänen et al., 2005). Die zugrundeliegende Hypothese ist, dass Hühnerlinien mit einer sehr hohen Legeleistung eine geringere Toleranz gegenüber sich ändernder Umwelteinflüsse, einschließlich Infektionen, haben. Die Leistungen des Immunsystems sind unter weitgehend kontrollierten Haltungs- und Hygienebedingungen kein signifikanter Selektionsvorteil. Allelische Vielfalt in Immungenen kann zufällig oder durch eine genetische Assoziation mit Leistungsmerkmalen in der Selektion verloren gehen. Dies führt zu einer genetischen Verarmung und ggf. einer Reduktion der Adaptionsfähigkeit einer Population. Um die durch Leistungsselektion hervorgerufene Veränderung anderer Merkmale von normalen evolutionären Veränderungen zu unterscheiden, müssen phylogenetisch divergente Linien in den Versuch einbezogen werden. Denn Veränderungen in Merkmalen, die nicht direkt als Selektionsmerkmal genutzt aber dennoch durch die Selektion beeinflusst wurden, sollten in phylogenetisch divergenten Vergleichsgruppen (Weißleger vs. Braunleger) gleichgerichtete Veränderungen aufweisen. Folglich wurden 4 verschiedene Legehennenlinien untersucht: Hochleistungsleger weiß (WLA, Weißes Leghorn), Minderleistungsleger weiß (R11), Hochleistungsleger braun (BLA, Rhode Island Red) und Minderleistungsleger braun (L68, New Hampshire) (Abb. 2). Zudem steht die Immunkompetenz in direkter Beziehung zur Erregerabwehr und der Wirksamkeit von Vakzinen. Genetisch divergente Populationen können auf prophylaktische und therapeutische Maßnahmen sehr unterschiedlich reagieren. So wurde bereits gezeigt, dass Hühnerlinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund verschieden auf bakterielle, virale und Pilzinfektionen reagieren (Kim et al., 2008; Sironi et al., 2008; Coble et al., 2011; Norup et al., 2011; Tippenhauer et al., 2012). In vorangegangenen Studien mit den beschriebenen Legehennenlinien konnten bereits Unterschiede in der Toleranz gegenüber Futterveränderungen zwischen den Linien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund beobachtet werden (Lieboldt et al., 2015a, b).

1. Einleitung

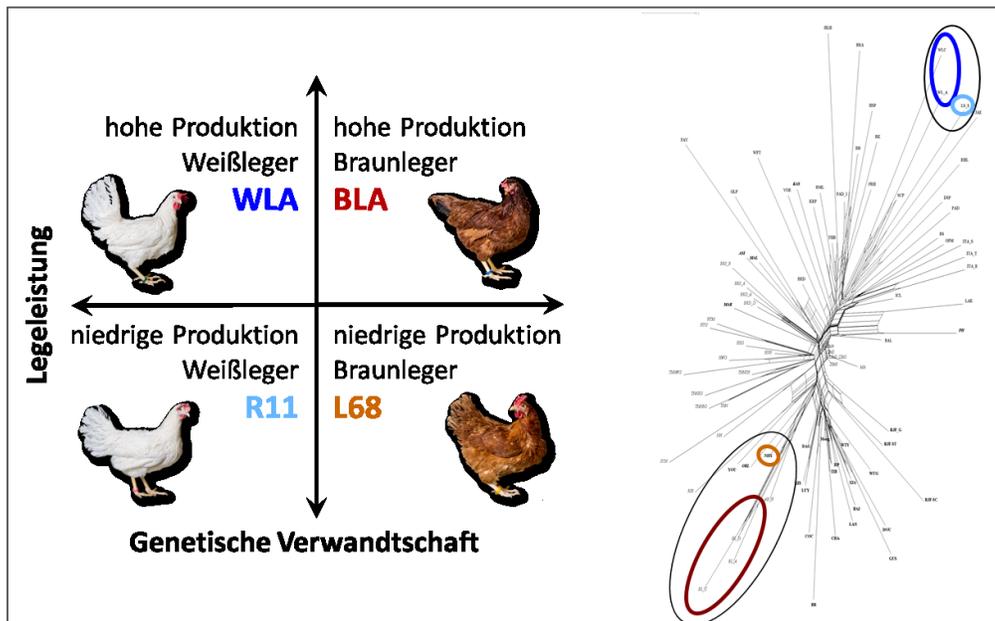


Abb. 2: Übersicht über die untersuchten Hühnerlinien. Gezeigt ist ihre Verwandtschaft zueinander und ihrer Legelleistung. Es wurde jeweils eine weiße und eine braune Linie verwendet, die auf eine hohe Legelleistung selektiert wurden (WLA und BLA) und deren ursprüngliche, nicht auf hohe Legelleistung selektierte, verwandte Linie (R11 und L68).

4. Zielsetzung

1. Um $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn funktionell zu charakterisieren, muss zunächst ein Zellkultursystem für primäre Lymphozyten etabliert werden um die Zellen zu erhalten, zu aktivieren und zu vermehren. Laut Literatur werden in diversen Spezies die verschiedensten Mitogene und Interleukine in Kombination zur Kultivierung und Aktivierung von primären Leukozyten verwendet. Hingegen ist bis heute nicht zweifellos bekannt, welche Voraussetzungen zur *in-vitro* Aktivierung, Differenzierung, Erhaltung oder Expansion von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen gegeben sein müssen. Um möglichst alle $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen, werden nicht-spezifisch wirkende Mitogene verwendet, die ohne Hilfe eines Rezeptors Signalwege innerhalb der Zelle anschalten können. Getestet werden sollen die für humane $\gamma\delta$ -T-Zellen als starke Stimulanzen bekannte Pyrophosphatantigene IPP und HMBPP. Des Weiteren scheinen die für Schweine und Rinder $\gamma\delta$ -T-Zellen gut funktionierenden Molekülverbindungen PMA, PHA und ConA vielversprechende Kandidaten zu sein. Abschließend werden auch verschiedene zur Erhaltung und Expansion benötigte Zytokine wie IL-2, IL-12 und IL-15 verwendet.

1. Einleitung

Der Aktivierungsstatus einer T-Zelle wird gewöhnlich über ihre Proliferationsaktivität oder die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern bestimmt. Ein klassischer Aktivierungsmarker für aviäre T-Zellen ist CD25, die alpha-Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors. Beide Parameter lassen sich sehr gut durch die durchflusszytometrische Analyse der Zellen messen.

2. Da durch Hühner und Hühnerprodukte übertragenen Salmonellen für den Menschen nach wie vor ein wichtiges Gesundheitsrisiko sind, soll die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen während einer *Salmonella*-Infektion beim Huhn näher untersucht werden. Bisher ist lediglich bekannt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Huhn, aber auch bei anderen Spezies bereits kurz nach der Infektion des Darms in dessen Epithelschicht einwandern. Spezifische Funktionen der einzelnen Subpopulationen während der Klärung einer Infektion sind jedoch insbesondere für das Huhn noch weitestgehend unbekannt. Dafür sollen spezifische Zytokinprofile der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen erforscht werden, die Rückschlüsse auf deren Funktion während der Immunreaktion zulassen. Dazu gehört auch die Erforschung der Differenzierung in funktionelle Subpopulationen anhand der Expression weiterer Oberflächenantigene und spezifischer Rezeptoren. Diese funktionellen Studien werden mit Hilfe einer *in-vitro* Stimulation der Zellen mit *Salmonella* Enteritidis durchgeführt.

Ein für die Weiterentwicklung von Impfstoffen wesentlicher Bestandteil ist das Verständnis über die Gedächtnisbildung des Immunsystems gegen ein bestimmtes Pathogen. Bisher ist nicht bekannt, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Huhn zur Ausbildung einer Gedächtnisfunktion in der Lage sind. Gedächtniszellen bilden sich normalerweise während der Kontraktionsphase der Immunreaktion, in der die meisten Effektorzellen absterben und nur die übrigen 5 % als Gedächtniszellen überleben (Kaech et al., 2012; Chang et al., 2014). Diese überleben antigen-unabhängig und sind zur Selbsterneuerung befähigt. Bei einem zweiten Zusammentreffen mit dem gleichen Antigen sind sie zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort in der Lage, die zumeist durch eine stärkere Proliferation und schnelleren Reaquirierung von Effektorfunktionen gekennzeichnet ist (Rocha and Tanchot, 2004; Cui and Kaech, 2010; Chang et al., 2014). Um dies zu erforschen, sollen Eintagsküken nach angewandtem Impfbefregime mit einem Lebendimpfstamm von *S. Enteritidis* immunisiert und in entsprechenden Abständen geboostert werden um die Bildung von Gedächtniszellen anzuregen. Danach sollen die Lymphozyten dieser Tiere *ex-vivo* re-stimuliert werden um eine mögliche Gedächtnisleistung der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu untersuchen. Diese sollte sich durch eine schnellere Aktivierung und/oder Proliferation von einzelnen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation auszeichnen. Diese Parameter können wiederum durchflusszytometrisch ermittelt werden.

1. Einleitung

3. Ziel des übergeordneten Projekts war, den Einfluss der Selektion auf eine hohe Legeleistung auf verschiedene Merkmale, darunter die immunologische Kompetenz, zu untersuchen. Dafür wurden vier Legehennenlinien untersucht, die sich in ihrer Legeleistung und Phylogenie unterscheiden. Dafür wurden folgende Hühnerlinien verwendet: „Weißes Leghorn“ Hühner mit hoher Legeleistung (WLA) sowie eine nicht auf Legeleistung selektierte Linie mit dem Namen R11. Dazu kamen „Rode Island Red“ braune Hühner mit hoher Legeleistung (BLA) und „New Hampshire“ braune Hühner mit niedriger Legeleistung (L68).

Um Unterschiede in der Immunkompetenz der Tiere zu erforschen, soll die $\gamma\delta$ T-Zellantwort bei sowohl nicht-spezifischer Stimulation als auch bakterieller Stimulation durch enterale Salmonellen untersucht werden. Zum einen soll eine Stimulanz gefunden werden, dass bei allen Hühnerlinien gleichermaßen die $\gamma\delta$ -T-Zellen stimuliert um diese in Kultur zu erhalten, zu aktivieren und zu vermehren. Zum anderen soll die Immunkompetenz gegenüber der für Hühner bedeutsamen Salmonellen studiert werden, da eine Selektion auf hohe Legeleistung möglicherweise einen negativen Einfluss auf diese hatte.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

Einmalkanülen (23 G)	neoLab, Heidelberg, Dtl.
Einmalspritzen (2ml, 5 ml)	Sigma-Aldrich, München, Dtl.
Kryoröhrchen (2 ml)	Brand, Gießen, Dtl.
Mehrfachkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Dtl.
Pasteurpipetten	VWR International, Dresden, Dtl.
Filterspitzen	Biodeal Edelmann e. K., Markkleeberg, Dtl.
PCR-Tubes (0,2 ml) und strips	Biodeal Edelmann e. K., Markkleeberg, Dtl.
PCR-Flat cap strips für QPCR	Biodeal Edelmann e. K., Markkleeberg, Dtl.
Petrischalen (55 × 15mm)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Dtl.
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Dtl.
Reaktionsgefäße (0,5 - 2 ml)	VWR International, Dresden, Dtl.
Zentrifugenröhrchen	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Microvette® 200 K3E,	Sarstedt, Nürnberg, Dtl.
Monovette® 2.7 ml EDTA K,	Sarstedt, Nürnberg, Dtl.
Truecount tube	BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Dtl.
MS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.
ThinCert Zellkultur Einsätze 12-Well	Greiner bio-one, Frickenhausen, Dtl.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Dtl.
BSA	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
DEPC	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.

2. Material und Methoden

Ethanol ($\geq 99,8\%$ (v/v))	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Kristallviolett	VEB Laborchemie Apolda, Dtl.
Stickstoff (li)	Linde, Höllriegelskreuth, Dtl.

2.1.3 Kits und Fertiglösungen

One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNase-Free-DNase Set	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
QuantiTect SYBR Green real-time one-step RT-PCR kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
Anti-FITC Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.
Annexin V-FITC apoptosis detection Kit I	BD, Heidelberg, Dtl.

2.1.4 Reagenzien für die Zellisolation und Zellkulturversuche

Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
FCS Standard	PAA, Cölbe, Dtl.
Gentamicin (10mg/ml)	PAA, Cölbe, Dtl.
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Hühnerserum	PAA, Cölbe, Dtl.
Interleukin-2 (IL-2)	Kingfisher Biotech, USA
IL-12	Kingfisher Biotech, USA
IL-15	Kingfisher Biotech, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Cölbe, Dtl.
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Phytohaemagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
RPMI 1640 (ohne Phenolrot)	PAA, Cölbe, Dtl.

2. Material und Methoden

2.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien

Propidium Jodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Cell Proliferation Dye eFluor450	eBioscience, Frankfurt, Dtl.
CaliBRITE beads	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.

Tab. 1: Monoklonale anti-Huhn Antikörper aus der Maus.

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Firma	Verdünnung
TCR1 ($\gamma\delta$ TCR)	FITC	TCR-1	Southern Biotechnology	1:500
CD8α	PE	CT-8	Southern Biotechnology	1:500
CD8β	unmarkiert	EP42	Southern Biotechnology	1:500
anti-IgG2α	PerCP-Cy5.5	RMG2a-62	BIOZOL Diagnostica	1:500
CD25	Alexa Fluor-647	13504	AbD Serotec	1:100
CD44	Biotin	AV6	Southern Biotechnology	1:500
MHC-II	Biotin	Cla	Southern Biotechnology	1:500
Anti-Biotin	Brilliant violet 510		Southern Biotechnology	1:500

2.1.6 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.) synthetisiert und als 0,3 M Lösung bei -20 °C gelagert. Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bereits zuvor in der Arbeitsgruppe synthetisiert, getestet und für Versuche verwendet und wurden dementsprechend bereits publiziert (Berndt et al., 2007).

Tab. 2: Weitere, bisher nicht veröffentlichte Primer.

RNA Target und Primerrichtung	Sequenz (5`-3`)	Annealing Temp. (°C)	Accession Nr.
IL-17A			NM_204460
Forward	GCTGGATGCCTAACCCAAAA	56	
Reverse	TCGATCCTGTAATCCCATGGA		
IL-21			
Forward	GCTGACTGCAACTTCACCAAA	56	NM_001024835
Reverse	GCAGCAATTCGACATCCTTATC		
IL-21R			
Forward	AGGCACTGGCTACTTCGGATTT	58	NM_001030640
Reverse	AGCTCTGTTGCTTGCCAGAA		

2. Material und Methoden

2.1.7 Puffer und Fertiglösungen

10 × PBS	100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 30 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,25 M; auf 1l mit A. dest. Auffüllen
FACSFlow	BD Bioscences, Heidelberg, Dtl.
FACSRinse	BD Bioscences, Heidelberg, Dtl.
FACSClean	BD Bioscences, Heidelberg, Dtl.
Heparin-Lösung	20 000 IE/ml in 0,9% (w/v) NaCl
Kochsalzlösung (physiologisch)	0,9 g NaCl in 1l A. dest
MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.

2.1.8 Geräte

Brutschrank Hera <i>Cell</i>	Kendro, Hanau, Dtl.
Heißluftschrank SUT 6120	Kendro, Hanau, Dtl.
Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Hanau, Dtl.
Mikroskop Jenamed2	Carl Zeiss, Jena, Dtl.
FACSCanto II	
488 nm, 633 nm and 405 nm Laser	BD Bioscences, Heidelberg, Dtl.
FACSAria II	
405 nm, 488 nm, 561 nm and 633 nm Laser	BD Bioscences, Heidelberg, Dtl.
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Dtl.
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.
pH-Meter CG 840	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Dtl.
Reinstwasseranlage Maxima	USF Elga, Ransbach-Baumbach, Dtl.
Sicherheitswerkbank HSP 18	Kendro, Hanau, Dtl.
SLK4 Magnetrührer	Schott, Jena, Dtl.
Thermocycler Primus 25 advanced®	Peqlab, Erlangen, Dtl.
Vortex Genie 2TM	Scientific Industries Inc., New York, USA

2. Material und Methoden

2.1.9 Software

FACSDiva Version 6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.
FlowJo Version 7.6.5	Tree Star Ashland, OR, USA
SPSS Version 19	SPSS Inc., Chicago, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corp., Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Bakteriologie und Tierversuche

2.2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Der verwendete *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Wildtyp-Stamm SE147 sowie der Impfstamm SalmoVac SE wurde von Dr. Ullrich Methner, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, FLI, Jena zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden über Nacht in *nutrient broth* (SIFIN, Berlin, Germany) bei 37°C kultiviert. Die KbE wurde mit Hilfe der Absorption bei 600 nm bestimmt und nachgehend durch Ausplattierung auf Blutagarplatten und Zählung bestätigt. Der Stamm wurde in einer Cryobank (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germany) bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Studie wurden Legehennen von 4 verschiedenen Selektionslinien benutzt: WLA (Weißes Leghorn; hohe Legeleistung) BLA (Rhode Island Red; hohe Legeleistung), R11 (Weißes Leghorn; niedrige Legeleistung) und L68 (New Hampshire; niedrige Legeleistung).

Eier der Linien WLA und BLA wurden von der Lohman Tierzucht GmbH, Deutschland, bezogen. Eier der Linien R11 und L68 wurden vom Institut für Farm Animal Genetics (Friedrich Loeffler Institut, Neustadt-Mariensee) bezogen. Alle Eier wurden im Tierhaus des Friedrich-Löffler-Instituts, Jena, bis zum Schlupf bebrütet und später gemeinsam gehalten. Die Tierhaltung erfolgte nach den Richtlinien der EU zur Animal Welfare. Die Hühner wurden unter Standardbedingungen in Bodenhaltung im Stall bei einer Raumtemperatur von 18-20°C und einer relativen Luftfeuchte von 50-60% gehalten. Die Tiere blieben während der gesamten Studie völlig unbehandelt und dienten lediglich als Blutspender für die *in-vitro* Versuche. Ausnahme war der Impfversuch (siehe Absatz 2.2.1.3). Antibiotika-freies Futter in Pulverform

2. Material und Methoden

und Wasser stand ihnen nach Belieben zur Verfügung. Die Studie erfolgte unter strenger Einhaltung der Richtlinien der Tierschutzkommission des Freistaats Thüringen (Registrierungsnummer: 04-001-14) und unter Aufsicht des institutsinternen Tierschutzbeauftragtem.

2.2.1.3 Immunisierungsversuch und Probenentnahme

Die immunisierte Gruppe und die unbehandelte Kontrollgruppe wurden in separaten Räumen gehalten. Reinigungs- und Fütterungsregimes waren so organisiert, dass eine Kontamination ausgeschlossen wurde. 88 Hühnerküken (22 pro Linie) wurden am Tag 2 und 7 nach dem Schlupf immunisiert. 7 Hühner pro Linie wurde anschließend am Tag 24 nach dem Schlupf Booster-immunisiert (1. Booster; 1.B) und 4 Hühner pro Linie wurden im Alter von 175 Tagen ein zweites Mal Booster-immunisiert (2.B). Immunisierung und Booster-Immunisierung erfolgte über eine Schluckimpfung mit Hilfe einer flexiblen Kanüle. Jedes Tier bekam eine Keimdosis von $1-2 \times 10^8$ KBE (in 0,1 ml, nach Herstellerangaben) pro Immunisierung verabreicht (SalmoVacSE, IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau). Weitere 88 Tiere (22 pro Linie) blieben unbehandelt und dienten als Kontrollen.

Tab. 3: Übersicht über den Versuchsaufbau und die Probenentnahme des Tierversuchs. Dargestellt sind die Anzahl der Tiere, die Zeitpunkte der Probenentnahme und die resultierenden Versuche und Sekundärproben. 6 Tiere pro Linie der behandelten und der unbehandelten Gruppe wurden am 8. (6 dpi) und 15. Lebenstag (13 dpi) und 3 Tiere am 22. Lebenstag (20 dpi) und 1 Tag nach der ersten Booster-Immunisierung (dp1.B; 25. Lebenstag) getötet. Vier Tiere jeder Versuchsgruppe und Linie blieben bis zum Ende der Studie am Leben. dp: Tage post; Im: Immunisierung; 1.B: erste Booster-Immunisierung; 2.B: zweite Booster-Immunisierung; T: Tötung der Tiere; B: Blutentnahme über *Vena ulnaris*; *: Daten nicht gezeigt (Mengen an isolierten Zellen zu gering).

Lebenstag	2	8	15	22	24	25	56	169	175	178	181	192	246
Tag der und nach Behandlung	SEvac Im	6 dpi	13 dpi	20 dpi	SEvac 1.b	1 dp1.b	32 dp1.b	145 dp1.b	SEvac 2.b	3 dp2.b	6 dp2.b	17 dp2.b	71 dp2.b
0,5 ml EDTA Blut (Zellzahlen)		x	x	x		x	x			x			
2,0 ml Heparinblut (Re- Stimulation)		x*	x	x		x		x					x
2,0 ml Heparinblut (RT- PCR nach Re- Stimulation)										x	x	x	
Anzahl der Tiere/ Linie	22	6	6	3	7	3	4		4	4	4	4	4

2. Material und Methoden

Probennahme durch	T	T	T	T	B		B	B	B	B
-------------------	---	---	---	---	---	--	---	---	---	---

Bis zum 25. Lebensstag der Tiere wurde das Blut nach tierschutzgerechter Tötung entweder in EDTA-Monovetten (0,5 ml) oder Heparin-befüllten Röhrchen aufgefangen.

Ab dem 64. Lebensstag der Tiere wurde das Blut über die Vena ulnaris gewonnen (0,5 ml in EDTA-Monovette, 2 ml in Heparin-befüllter Spritze).

2.2.1.4 Verarbeitung der EDTA-Blutproben

Um die absolute Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen im Blut zu messen, wurden 20 μ l Vollblut zu 980 μ l PBS gegeben und fortan im Rotator vermischt. 20 μ l eines Antikörper-Cocktails bestehend aus TCR1-FITC, CD8 α -PE, CD8 β -BIOT, CD25-Alexa Fluor-647 und anti-anti-BIOT-DL405 wurden in einer vorher getesteten Konzentration auf das Metallplättchen eines Truocount-Röhrchens gegeben. Danach wurden 50 μ l des verdünnten Blutes hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min im Dunkeln wurden die Zellen per Durchflusszytometrie analysiert. Von jeder Probe wurden 50.000 Beads gemessen und zusammen mit den Zellzahlen für TCR1⁺ und CD8 α ⁺ T-Zellen gespeichert. Die Konzentration der Beads pro Truocount Röhrchen war LOT-spezifisch und vom Hersteller angegeben. Die absoluten Zellzahlen pro μ l wurden wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{positive Events (Zellen)}}{\text{positive Events (Beads)}} * c \text{ Beads}/\mu\text{l}$$

Es wurden jeweils die Zellzahlen für CD8 α ⁻, CD8 α ^{hi} β ⁺ und CD8 α ^{hi} T-Zellen bestimmt. Für jede Subpopulation wurden außerdem die Anzahl der CD25⁺ Zellen sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expressionsstärke von TCR1 und CD8 α via MFI analysiert.

2.2.2 Zellbiologische Arbeiten

2.2.2.1 Verarbeitung der Heparin-Blutproben

Für die *ex-vivo* SEvac Stimulations- und Re-Stimulationsexperimente wurden, Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) mittels der Zentrifugationsmethode bei niedrigen Umdrehungen nach Lavoie und Grasman (2004) mit einigen Änderungen isoliert. Vorteil dieser Methode ist, dass auf die Zugabe von Dichtegradientmedien oder ähnliches verzichtet wird und somit die Immunzellen so gering wie möglich mit toxischen oder aktivierenden Substanzen in Berührung kommen. Das Vollblut wurde unverdünnt bei

2. Material und Methoden

65 x g 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Dies resultierte in einer Fraktionierung des Blutes in drei Schichten: Die obere Schicht bestand aus Plasma und darin gelösten Lymphozyten; die mittlere enthielt den Großteil der Lymphozyten und in der unteren Schicht befanden sich Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten. Die Plasma- und Lymphozytenschicht wurde sehr vorsichtig abgenommen ohne die untere Schicht zu berühren und in ein neues Röhrchen überführt. Das verbleibende Blut wurde durchmischt und die Prozedur ein weiteres Mal wiederholt, um die Zellausbeute zu maximieren. Die geernteten Lymphozyten wurden einmal mit 5 ml 1x PBS gewaschen und abzentrifugiert, um Plasmaproteine zu verringern. Zum Schluss wurde die Zellsuspension bei 350 x g nochmals 15 min ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die isolierten Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) wurden in 1 x PBS resuspendiert und waren somit bereit für das Anfärben mit dem Proliferationsfarbstoff oder für andere Experimente.

2.2.2.2 Färbung der Zellen mit Proliferationsfarbstoff

Zur Analyse der Proliferationsaktivität wurden die frisch isolierten primären Lymphozyten mit dem *Cell Proliferation Dye eFluor450* markiert. Die Detektion der Zellproliferation via Durchflusszytometrie basiert auf der Abnahme der Menge des Proliferationsfarbstoffs in jeder neuen Zellgeneration. Der Proliferationsfarbstoff bindet an Proteine in der Zelle und ist über mehrere Tage stabil. Frisch isolierte Zellen werden zu 100 % angefärbt und sind durch eine starke Fluoreszenz im entsprechenden Kanal erkennbar. Bei jeder Zellteilung werden Proteine und damit der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, die nur noch eine Fluoreszenzintensität von 50 % im Vergleich zur Ausgangszelle aufweisen. Diese sukzessive Verdünnung des Farbstoffs ist im Durchflusszytometer messbar.

Die Markierung der Zellen erfolgte weitestgehend nach Herstellerprotokoll. Frisch isolierte Zellen wurden in 1 x PBS gelöst und auf eine Zellzahl von ungefähr 1×10^7 Zellen/ ml eingestellt. Zu der Suspension wurde 1 µl/ml des Proliferationsfarbstoffs gegeben und gut gemischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die 5-fache Menge an RPMI1640 Medium (mit 5 % FCS und 5 % Hühnerserum) zugegeben um die Färbereaktion zu stoppen und überschüssigen Farbstoff zu binden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit frischem Komplettmedium gewaschen. Danach waren die Zellen bereit zur Kultur.

2. Material und Methoden

2.2.2.3 Zellkultur der primären aviären Lymphozyten

Die isolierten aviären Lymphozyten wurden je nach Versuchsaufbau und zur Verfügung stehenden Blutmengen in 24-Well (etwa 5×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml) oder 48-Well Platten (300-500 μ l mit etwa 8×10^5 Zellen/ml) Platten in RPMI 1640 Medium bei 41°C und 5 % CO₂ kultiviert. Dem Medium wurde 5% FCS und 5 % hitzeinaktiviertes Hühnerserum zugesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte je nach Versuchsaufbau nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h bis zu 120 h. In Vorversuchen zur Optimierung der Kultur von primären aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die jeweils angegebenen Zusätze und Stimulanzen verwendet.

In weiteren Versuchen zur Untersuchung der $\gamma\delta$ -T-Zellenfunktion nach einer *Salmonella*-Infektion wurde dem Medium neben den standartmäßigen Zusätzen rekombinantes aviäres Interleukin-2 (IL-2) (50 U/ml) zugesetzt.

2.2.2.4 Stimulation mit Mitogenen und Wachstumsfaktoren

Für die Stimulationsversuche zur allgemeinen Erhaltung, Aktivierbarkeit und Vermehrung der aviären Lymphozyten wurden verschiedenen Stimulation benutzt, die in der Literatur standartmäßig zur Kultivierung und Aktivierung von Lymphozyten verwendet werden (Tabelle 4): PMA, Ionomycin, PHA, ConA, Interleukin-2 (IL-2), IL-12 und IL-15.

Tab. 4: Verwendete Stimulanzen zur Kultur von primären aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die fett hervorgehobene Zahl bedeutet jeweils die final verwendete Konzentration, die in den Ergebnissen gezeigt werden.

Stimulanz	Konzentrationen
PMA	50; 100 ; 250 ng/ml
Ionomycin	300 ng/ml
PHA	2,5; 5 ; 7,5 μ g/ml
ConA	5 ; 10; 15 μ g/ml
IL-2	2,5; 5 ; 10 ng/ml
IL-12	25 ; 50; 100 ng/ml
IL-15	25 ng/ml

2. Material und Methoden

2.2.2.5 Stimulation der PBL Kulturen mit Salmonellen

Zur Untersuchung möglicher Gedächtnisfunktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die isolierten PBLs ex-vivo mit dem *Salmonella* Enteritidis Impfstamm SEvac stimuliert (unbehandelte Kontrollgruppe) bzw. re-stimuliert (immunisierte Tiere). Die Infektionsrate betrug 1 Bakterium pro 10 Lymphozyten (multiplicity of infection (MOI) 0,1). 10 min nach Zugabe der Bakterien wurde das Antibiotikum Gentamycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzu gegeben um das weitere Wachstum der Bakterien zu verhindern. Unbehandelte Zellen mit IL-2 dienten als Kontrollen und wurden ebenfalls mit Gentamycin behandelt.

Für die weiterführenden funktionellen Analysen der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Rahmen einer *Salmonella*-Infektion wurde der Wildstamm SE147 ebenfalls in einer MOI von 0,1 verwendet. Zellkulturen, die nur mit Interleukin-2 (IL-2) (50 U/ml) supplementiert wurden, dienten als unbehandelte Vergleichskontrolle.

2.2.2.6 Chemotaxis von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen

Um zu untersuchen, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen der Hühner auf chemotaktische Reize reagieren und entsprechend in ein Zielgewebe einwandern können, wurden mittels Magnetbeads sortierte (Absatz 2.2.4), reine $\gamma\delta$ -T-Zellen in 12-Well Platten mit Transwell-Einsätzen eingesät. Als Chemoattraktant wurde konditioniertes Makrophagen-Medium benutzt. Die Monozyten-gereiften aviären primären Makrophagen wurden dazu mit *Salmonella* Entertidis in einer MOI = 10 infiziert und nach Zugabe von Gentamycin 48 h weiter kultiviert. Das konditionierte RPMI 1640 Komplettmedium wurde daraufhin geerntet und tote Zellbestandteile abzentrifugiert. Die Makrophagen sollten in dieser Zeit eine Reihe von Chemokinen in das Medium sekretiert haben. Dieses Medium wurde in eine 12-Well Platte pipettiert. In die Transwell Einsätze mit einer PET Membran mit einem 3 μm Porendurchmesser wurden die 200.000 reinen $\gamma\delta$ -T-Zellen in frischem RPMI 1640 Medium gegeben (Abb. 3). Als Kontrolle wurde frisches Medium in das untere Kompartiment gefüllt. In zwei weiteren Ansätzen wurden die reinen $\gamma\delta$ -T-Zellen vor dem Experiment ebenfalls mit Salmonellen stimuliert (MOI 0,1) und in Transwell Einsätze eingesät. Im unteren Kompartiment befand sich wiederum konditioniertes Makrophagen-Medium oder frisches RPMI 1640 Medium. Nach 4 h Inkubation wurden Zellen aus beiden Kompartimenten geerntet und mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Mittels FACS Analysen unter Zuhilfenahme von Counting Beads wurde die absolute Anzahl der nach unten gewanderten Zellen bestimmt.

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl Events (Zellen)} * \text{Volumen in } \mu\text{l}}{\text{Anzahl Events (Beads)} * \text{Volumen in } \mu\text{l}} * c \text{ Counting Beads } /\mu\text{l}$$

2. Material und Methoden

Es konnte damit untersucht werden, wie viele der 200.000 Zellen durch die Membran gewandert sind und welche $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen am migrationsfreudigsten waren. Anhand der Ausgangszellzahlen und der unten gemessenen Zellzahlen wurden die prozentualen Anteile der migrierten Zellen für jede $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation berechnet.

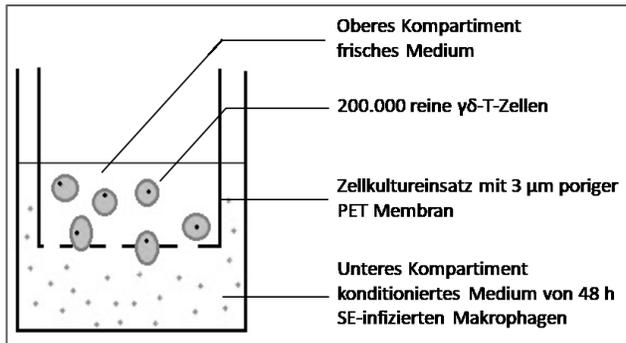


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus des Transwell-Assays. Die sortierten $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden in das Zellkultur-Insert eingesät, während sich im unteren Kompartiment in der 12-Well-Platte nur konditioniertes Medium von SE-infizierten aviären Makrophagen befand, das als Chemoattraktant für die $\gamma\delta$ -T-Zellen diente.

2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur simultanen Untersuchung von multiplen strukturellen und funktionellen Parametern von Einzelzellen innerhalb einer Zellsuspension. Dazu werden die suspendierten Zellen zuerst mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene gefärbt. Zur Analyse wird die Zellsuspension in einem laminaren Fluss von Trägerflüssigkeit (FACS-Flow) perlenschnurartig vereinzelt und hintereinander an Laserstrahlen vorbeigeführt. Die auftreffenden Laserstrahlen werden von den Fluorochromen der Antikörper zu Fluoreszenzlicht umgesetzt, das durch verschiedene Photodetektoren messbar ist. Diese Lichtsignale werden in proportionale Spannungspulse umgewandelt, verstärkt und an den Computer weitergeleitet, wo sie in elektronische Daten umgewandelt und jedem gemessenen Partikel zugeordnet werden. Die gewonnenen Daten können graphisch in Form von zwei-Parameter Dot Plots oder als eindimensionale Häufigkeitsverteilung (Histogramm) dargestellt werden. Gruppen von Zellen können anhand ihrer gleichen Eigenschaften zu Populationen zusammengefasst und als Einheiten markiert („Gating“). Durch gezielte „Gating“-Strategien werden die registrierten Fluoreszenz- und Streulichtparameter einer Zelle bei der Auswertung miteinander korreliert und einzelne Zelltypen auf ihre Eigenschaften hin analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels Mehrfachmarkierungen am FACSCanto II Durchflusszytometer phänotypisiert und die definierten $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen unter Einsatz eines FACSria Zellsorter separiert.

2. Material und Methoden

2.2.3.1 FACS-Analyse der primären aviären Lymphozyten

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden isolierten PBLs aus den Zellkulturen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern markiert. Um die beschriebenen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen zu untersuchen wurden Antikörper gegen TCR1, CD8 α und CD8 β verwendet. Zusätzlich wurde CD25 als Aktivierungsmarker der T Zellen analysiert. In einigen funktionellen Analysen wurden zudem CD44 und MHC-II untersucht. Diese beiden Antikörper lagen biotinyliert vor und wurden mit einem Streptavidin Antikörper detektiert (Tab. 1). Falls nicht anders beschrieben, wurde 100 μ l der Zellsuspension unter sterilen Bedingungen aus der Zellkultur entnommen und die entsprechende Menge des Antikörper-Mastermixes hinzugegeben. Alle Antikörper wurden stets in PBS verdünnt. Die optimalen Antikörperkonzentrationen wurden vor der Studie austitriert. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln waren die Zellen bereit zur Analyse. Zusätzlich wurden in einigen Experimenten die Zellen nach der Isolation mit einem Proliferationsfarbstoff angefärbt, der über seine Fluoreszenz bei 450 nm detektiert wurde.

Um einwandfreie multi-Parameter Daten zu generieren, wurde zu Beginn der vorgelegten Arbeit und in regelmäßigen Abständen eine Kompensation der verwendeten Antikörper und Fluorochrome angefertigt und bei jeder Messung angewandt. Eine fehlerfreie Kompensation ist bei mehrfach gefärbten FACS Analysen essentiell, da ansonsten Fluoreszenzlicht eines Antikörpers von verschiedenen Detektoren gemessen wird und es somit zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen kommt.

Die Analyse erfolgte mit einem FACSCanto II Durchflusszytometer, welches mit einem violetten, einem blauen und einem roten Laser ausgestattet war und 8 verschiedene Fluoreszenzkanäle gleichzeitig messen konnte. Unter Anwendung der oben beschriebenen optimalen Einstellungen wurden die Lymphozytensuspensionen bei einer maximalen Durchflussrate von 2000 events/s analysiert. Wiesen die Proben eine höhere Zelldichte auf, wurden sie vor der Messung mit PBS verdünnt. Es wurden, wenn möglich, immer 100.000 Partikel im „Lymphozyten Gate“ analysiert.

2.2.3.2 Auswertung der FACS-Daten

Alle durchflusszytometrischen Daten wurden mit Hilfe der FASCDiva Software analysiert. Die Gating Strategie ist in Abbildung 4 gezeigt. Nach dem Einkreisen der Lymphozyten, wurden die Events nach ihrer TCR1- und CD8 α -Expression aufgetrennt. Dabei ließen sich die CD8 α^- und CD8 α^+ $\gamma\delta$ -T-Zellen unterscheiden. Für die weitere Auftrennung der CD8 α^+ Population, wurden diese Zellen weiter nach ihrer CD8 α und CD8 β Expression aufgetrennt. Für jede der drei Hauptpopulationen wurden zudem der Anteil

2. Material und Methoden

CD25⁺ Zellen analysiert. Außerdem erfolgte die Bestimmung des Anteils der proliferierten Zellen anhand ihrer schwächeren Fluoreszenz des Proliferationsfarbstoffs verglichen mit der Ausgangspopulation.

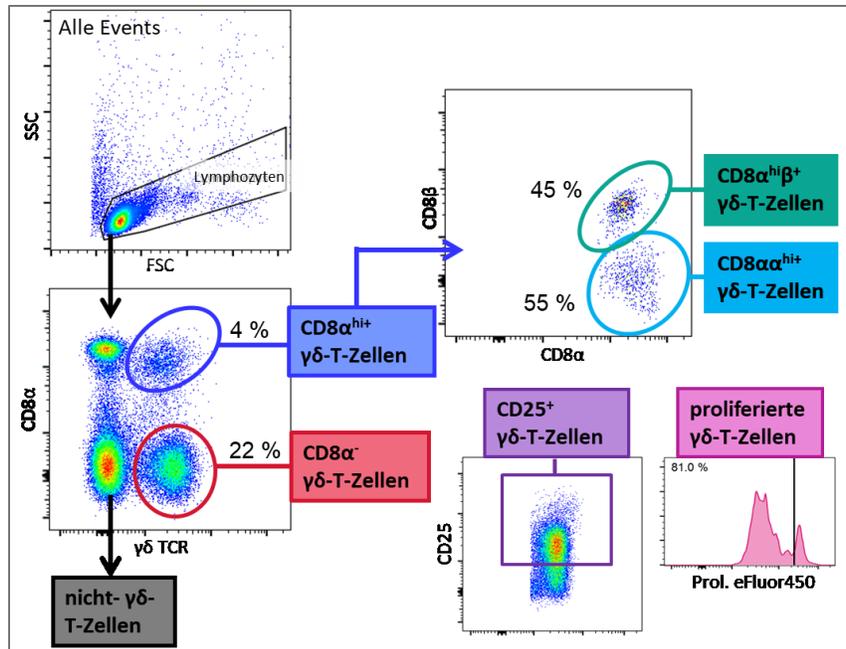


Abb. 4: Gating Strategie der aviären $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen. Bei der Messung wurde bereits zellulärer Debris verworfen und nur die Lymphozytenpopulation analysiert. $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden anhand ihrer TCR1- und CD8 α - Expression von den restlichen Lymphozyten abgegrenzt, sowie Populationen anhand ihrer CD8 α - oder CD8 β - Expression aufgespalten. Die Analyse der CD25⁺ Zellen sowie der proliferierten Zellen erfolgte selbstverständlich für jede $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulation separat und ist hier nur exemplarisch gezeigt.

Für die spezialisierte und tiefer gehende Analyse der Zellproliferation wurde zudem die FlowJo Software benutzt. Dabei wird die Ausgangspopulation mit der stärksten Fluoreszenz des Proliferationsfarbstoffs festgelegt. Die Software entwirft ein Modell der Tochtergenerationen auf Basis der Fluoreszenzpeaks mit einer Abnahme der Intensität um ungefähr 0,5 pro Generation. Dieses Modell ist individuell anpassbar. Drei verschiedene Parameter wurden kalkuliert: Der Proliferations-index, welcher die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen aller proliferativ aktiven Zellen abbildet. Berechnet wird dieser Wert mit Hilfe der Anzahl, der gesamt stattgefundenen Teilungen, geteilt durch die Anzahl der Zellen, die mindestens einmal in Teilung gegangen sind. Dazu muss zuvor anhand der Anzahl der geteilten Zellen jeder Generation die Anzahl der ursprünglichen Zellen berechnet werden. Er gibt letztendlich die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen wieder, aber nur für Zellen, die überhaupt in Zellteilung gegangen sind. Der prozentuale Anteil der reagierenden Zellen wird berechnet, indem die Anzahl der Zellen, die zu Beginn der Kultur vorhanden waren, durch die Anzahl derer geteilt wird, die in Zellteilung gegangen sind (\cong % geteilt).

2. Material und Methoden

2.2.3.3 Durchflusszytometrische Zell-Sortierung

Die durchflusszytometrische Zellsortierung erwies sich als besser geeignet, da mehrere Populationen auf der Basis verschiedener Oberflächenmarker auf einmal separiert werden können. Die Reinheit ist dabei ebenfalls höher als beim Benutzen von MACS Multisort Kits. Für die Zellsortierung wurde ein FACSAria-Fusion Zellsorter mit dem Sortprinzip des abreißenden Flüssigkeitsstrahls verwendet. Dabei geht der Flüssigkeitsstrahl durch das Schwingen der Nozzle in einem konstanten Abstand zur Nozzle in kleine Flüssigkeitstropfen über, die jeweils eine Zelle enthalten. Tropfen mit zu sortierenden Zellen werden am Abrisspunkt geladen und im nachfolgenden elektrischen Feld in Seitenstrahlen abgelenkt.

Um eine genau Selektion von Zellen zu gewährleisten, wurde das Gerät vor der Sortierung optimal eingestellt. Dazu wurde nach der PMT-Kalibrierung der kürzeste stabile Tropfenabrisspunkt ermittelt und die Erzeugung einzelner, definierter und gerichteter Seitenstrahlen sichergestellt. Die Einstellungen wurden in einer Testsortierung überprüft.

Die PBL Kulturen wurden nach 24 h, 72 h und 120 h komplett geerntet und je 1×10^7 Zellen mit $\gamma\delta$ TCR-FITC, CD8 α -PE, CD8 β -unmarkiert und anti-IgG2 α -PerCP-Cy5.5 gefärbt. Alle Antikörperkonzentrationen wurden vorher austitriert. Nach erfolgter Optimierung und Kontrolle der FACS-Einstellungen wurden unter Benutzung der 4-way Purity Sort Einstellungen simultan 4 unterschiedliche Subpopulationen sortiert. Bei dieser Einstellung werden nicht genau zuordenbare Partikel eher verworfen um die Reinheit zu maximieren. Die Sortierung erfolgte bei 4°C und mittels einer der markierten Zellen bei einer 70 μ m Nozzle bei einer Durchlaufrate von 6000-8000 events/s. Tote Zellen, Debris und Dubletten wurden über FSC/SCC Gating vor dem Gating der gewünschten Populationen ausgeschlossen. Die sortierten Zellen wurden jeweils in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 500 μ l Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 10 % Hitze-inaktiviertem Hühnerserum aufgefangen. Je nachdem ab wann suffiziente Zahlen der fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen in den Kulturen vorhanden waren, wurden drei bzw. fünf Populationen sortiert. Für einen 5-fach Sort wurde zuerst die CD8 α^{hi} Population komplett separiert um dann in einem zweiten Sortierschritt die drei Subtypen innerhalb dieser Population zu trennen. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde nach der Sortierung überprüft und betrug stets 90-100 %. Die folgenden 5 $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen wurden sortiert: TCR1⁺CD8 α ⁻, TCR1⁺CD8 α^{hi} , TCR1⁺CD8 $\alpha^{hi}\beta^+$, TCR1^{hi}CD8 α^{lo+} und TCR1^{hi}CD8 α^{exhi} .

Die separierten Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und in RLT-Puffer mit 0.14M 2-Mercaptoethanol lysiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Aufgrund sehr niedriger Zellzahlen wurden jeweils mehrere Proben vereint um eine Mindestzellzahl von 100.000 Zellen pro RNA-Isolation zu erreichen. Bei den TCR1⁺CD8 α^{hi} und TCR1⁺CD8 $\alpha^{hi}\beta^+$ Subpopulationen wurden jeweils 2 Proben pro Zeitpunkt und Stimulation gepoolt, was in einer Probenzahl von 3 Proben pro

2. Material und Methoden

Zeitpunkt und Stimulation resultierte. Für die $\text{TCR1}^{\text{hi}}\text{CD8}\alpha^{\text{lo+}}$ und $\text{TCR1}^{\text{hi}}\text{CD8}\alpha^{\text{exhi}}$ Zellen waren jeweils 3 bis 6 Proben notwendig um die erforderliche Zellzahl zu erreichen, wodurch nur noch 1 Probe pro Zeitpunkt und Stimulation erreicht wurde. Zudem waren 24 h nach Start der Zellkultur nur sehr geringe Zellzahlen der $\text{TCR1}^{\text{hi}}\text{CD8}\alpha^{\text{lo+}}$ und $\text{TCR1}^{\text{hi}}\text{CD8}\alpha^{\text{hi}}$ Population vorhanden, sodass diese nicht sortiert wurden. Die Zahlen der $\text{TCR1}^{\text{hi}}\text{CD8}\alpha^{\text{lo+}}$ Zellen waren weiterhin nach 72h in den Kontrollzellkulturen zu niedrig um genügend RNA zu isolieren.

2.2.4 Sortierung $\gamma\delta$ T-Zellpopulation mittels magnetischer Beads

Die $\gamma\delta$ T-Zellpopulation wurde mit Hilfe der MACS Technik (Miltenyi Biotec) nach 24 und 48 h aus der gesamten PBL Kultur heraus isoliert. Die Methode basiert auf einer magnetischen Markierung der gewünschten Zellen, wobei alle übrigen Zellen ungehindert das Magnetfeld passieren und eluiert werden können. Die Zellen wurden dazu geerntet und mit $1\ \mu\text{g TCR1-PE Antikörper}/100\ \mu\text{l Zellsuspension}$ markiert. Nach der Färbung für 20 min im Dunkeln wurden die Zellen mit anti-PE Microbeads in einem Verhältnis von 1:5 inkubiert. Alle TCR1-PE positiven Zellen waren somit an magnetische Partikel gebunden. Für die Separation wurden LS Säulen und der QuadroMACS Separator benutzt und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Die reinen $\gamma\delta$ T-Zellen wurden am Ende eluiert. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug immer $\geq 98\ \%$.

2.2.5 Genexpressionsanalysen

2.2.5.1 RNA-Gewinnung aus sortierten Zellen

Die sortierten Zellen wurden in RLT Puffer (Qiagen) mit $0,14\ \text{M 2-Mercaptoethanol}$ lysiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei -80°C bis zur RNA-Isolation gelagert. RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll isoliert.

2.2.5.2 Quantitative real time RT PCR

Für die Untersuchung der RNA-Expressionslevel verschiedener Zytokine wurde das QuantiTect SYBR Green real-time one-step RT-PCR kit (Qiagen) benutzt. Die Sequenzen der Hühner-spezifischen Primer für IFN- γ , LITAF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-17, IL-21, IL-22, IL-2R α , IL-7R α , IL-15R α , IL-21R und GAPDH sind in Tabelle 3 aufgelistet.

2. Material und Methoden

Zur Analyse der RNA-Expressionslevel wurde die Threshold Methode nach Kokab angewandt. Es erfolgte zudem die Normalisierung auf das Housekeeping Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Tab. 5: Zusammensetzung des RT-PCR Ansatzes. Je 1-3 μl RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 25 μl aufgefüllt.

Komponente	5x Puffer*	dNTPs	F-Primer	R-Primer	Enzym
Volumen	5 μl	1 μl	0,75 μl	0,75 μl	1 μl

* 5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer

Tab. 6: qRT-PCR Programm

Temperatur	Zeit	Schritt
50 °C	30 min	Reverse Transkription
95 °C	15 min	Denaturierung, Inaktivierung der reversen Transkriptase
94 °C	30 s	Denaturierung
T_A °C	30 s	Primer Annealing
72 °C	30 s	Polymerisation
95 °C	30 s	Denaturierung
55 °C	30 s	Re-Annealing
55.95 °C	ca. 30 min	Schmelzkurvenanalyse

2.2.6 Statistische Analyse

Alle erhobenen Daten wurden mit Hilfe von SPSS Statistics statistisch ausgewertet. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den stimulierten und unstimulierten Proben (Kontrollen), den verschiedenen Hühnerlinien und Versuchsgruppen oder zwischen den 5 untersuchten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen zu untersuchen, wurde ein Mann-Whitney U Test durchgeführt. Ein p-Wert ≤ 0.05 wurde als Signifikanzgrenze festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der Kulturbedingungen und Austestung der Stimulierbarkeit von primären aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen

Da es bisher kein standardisiertes Zellkulturmodell für primäre aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen gibt, sollte zu Beginn der Arbeit zunächst ein passendes Zellkultursystem für etabliert werden. Ziel war die Erhaltung, aber auch die Aktivierung und Induktion von Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen in Kultur. Dazu wurde eine Reihe verschiedener und typischerweise benutzter Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen verwendet. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

3.1.1 CD25 Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Wirkstoffen

Zellen des unstimulierten Kontroll-Wells zeigten spontan eine leicht erhöhte Anzahl an CD25⁺ Zellen in allen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen. Die stärkste Erhöhung wies allerdings die CD8 α ⁻ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation ($p \leq 0.05$) nach 72 und 96 h Kultur auf (Abb. 5a-c). Im Gegensatz zum prozentualen Anteil CD25⁺ Zellen veränderte sich die CD25 Expressionsintensität (MFI) der CD25⁺ Zellen in allen $\gamma\delta$ T- Zellpopulationen nur geringfügig über die Zeit (Abb. 6a-c). Trotz dessen war ein signifikanter Anstieg der Expression in CD8 α ⁻ und CD8 α ^{hi+} Zellen nach 72 h im Vergleich zu 48 h messbar ($p \leq 0.05$).

Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen führte die Stimulation mit PMA zu einer signifikanten Erhöhung des prozentualen Anteils der CD25⁺ Zellen in allen $\gamma\delta$ T- Zellpopulationen. Es stieg vor allem die Anzahl der CD25⁺CD8 α ⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen sehr schnell an, die ein Maximum von fast 100 % nach 72 h Kultur erreichte (Abb. 5d). Weiße Linien zeigten zudem im frühem Stadium eine erhöhte Anzahl der CD25⁺CD8 α ^{hi+} Zellen im Vergleich zu braunen Linien (Abb. 5d-f). Das Expressionslevel von CD25 zu jedem Messzeitpunkt signifikant ($p \leq 0.05$) in CD8 α ⁻ und CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen erhöht. Zusätzlich war die CD25 Expression in allen Hühnerlinien auf CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen nach 24 und 48 h signifikant höher als in unstimulierten Proben (Abb. 6d-f).

Nach Zugabe von IL-2 zu den Kulturen der primären aviären Lymphozyten wiesen alle $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen im Allgemeinen eine signifikant geringere Anzahl an CD25⁺ Zellen bei gleichzeitig niedrigerer Expression verglichen mit PMA-stimulierte Kulturen zu allen Messzeitpunkten auf (Abb. 5g-i; 6g-i). Genau wie nach PMA Stimulation stieg der Anteil der CD25⁺CD8 α ⁻ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation im Vergleich zur Kontrolle nach 24 und 48 h signifikant an und blieb auch nach 72 und 96 h auf einem stabilen

3. Ergebnisse

Level (Abb. 5g). Hingegen zeigten beide $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen verglichen mit Kontrollen einen niedrigeren Anteil $CD25^+$ Zellen nach 72 und 96 h IL-2 stimulierter Kultivierung (Abb. 5h, i).

Das Expressionsniveau von CD25 war in allen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen unter IL-2 Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle kaum verändert, und niedriger als in PMA-stimulierten Kulturen (Abb. 5g-i).

Die Kombination von beiden Stimulanzen übte einen synergistischen Effekt auf die Aktivierung und Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen aus. Die Anzahl der $CD25^+$ Zellen, deren CD25-Expressionsintensität und die Anzahl geteilter Zellen war im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen deutlich erhöht.

Die $CD8\alpha^-$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation zeigte ähnliche Veränderungen bezüglich ihrer CD25-Expression wie die nur mit PMA stimulierten Proben. Der prozentuale Anteil $CD25^+$ Zellen sowie deren CD25-Expressionsintensität war signifikant erhöht im Vergleich zu unstimulierten und zu IL-2 stimulierten Zellkulturen (Abb. 5j, 6j). Alle $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen zeigten ähnliche Anstiege der CD25 Expression wie unter PMA-Stimulation. Im Vergleich zu nur mit IL-2 stimulierten Proben war die Expression allerdings nach 72 h und 96 h signifikant erhöht (Abb. 6k, l). Die Anzahl der $CD25^+$ Zellen war jedoch im Vergleich zu PMA-stimulierten Proben in den $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen oftmals deutlich verringert (Abb. 5k, l).

3. Ergebnisse

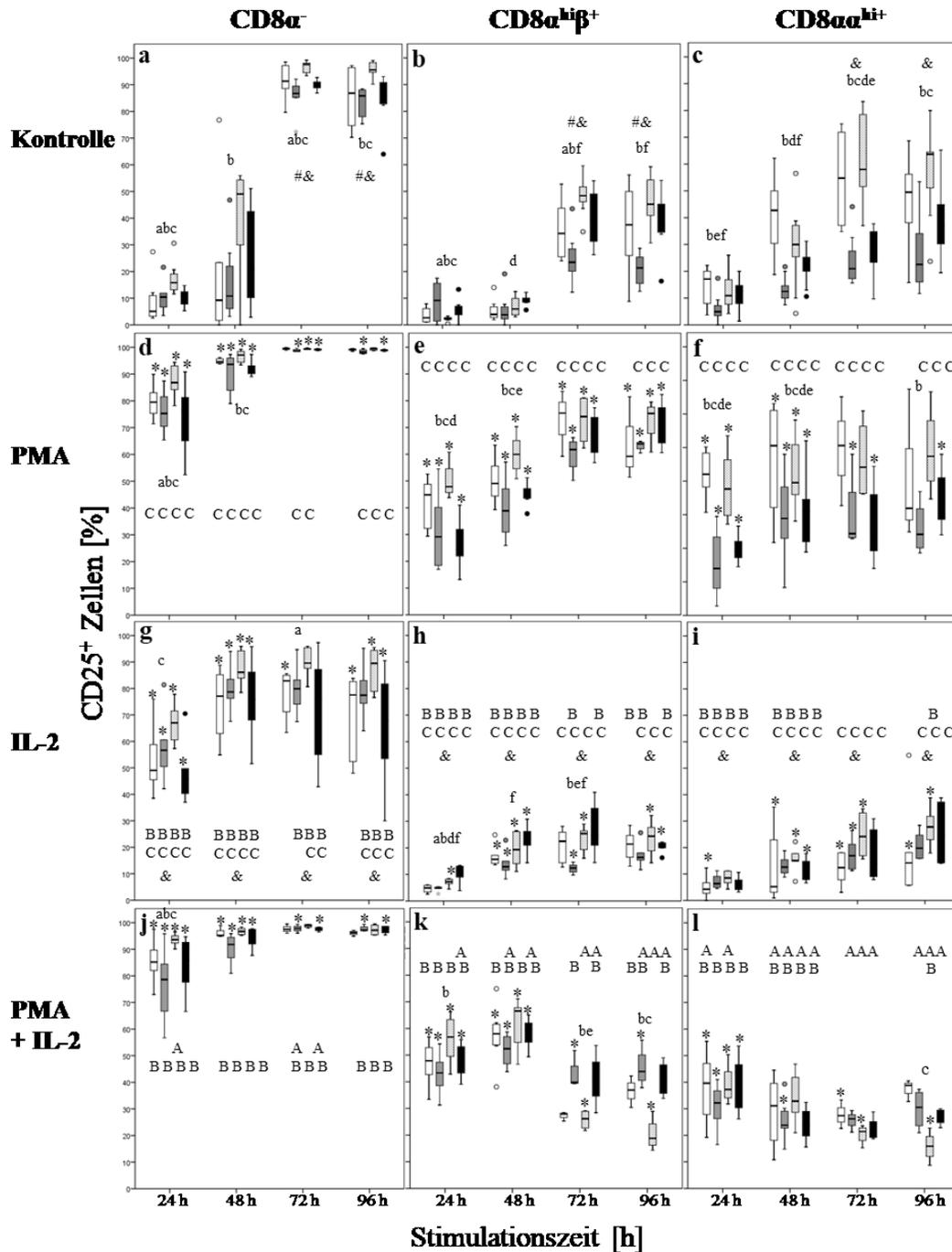


Abb. 5: Prozentualer Anteil CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit PMA, IL-2, oder PMA + IL-2. Kontrollen blieben unstimuliert. Es wurden 4 verschiedenen Hühnerlinien verwendet: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ■ L68. Signifikanzen: *: stimuliert vs. Kontrolle; A: PMA vs. PMA+IL-2; B: IL-2 vs. PMA+IL-2; C: PMA vs. IL-2; &; (in allen Linien) CD8 α ⁻ vs. CD8 α ^{hi} β ⁺ und CD8 α ^{hi}. a: R11-WLA; b: R11-BLA; c: R11-L68; d: WLA-L68; e: WLA-BLA; f: BLA-L68. #: (in allen Linien) 48 h vs. 72 h und 96 h.

3. Ergebnisse

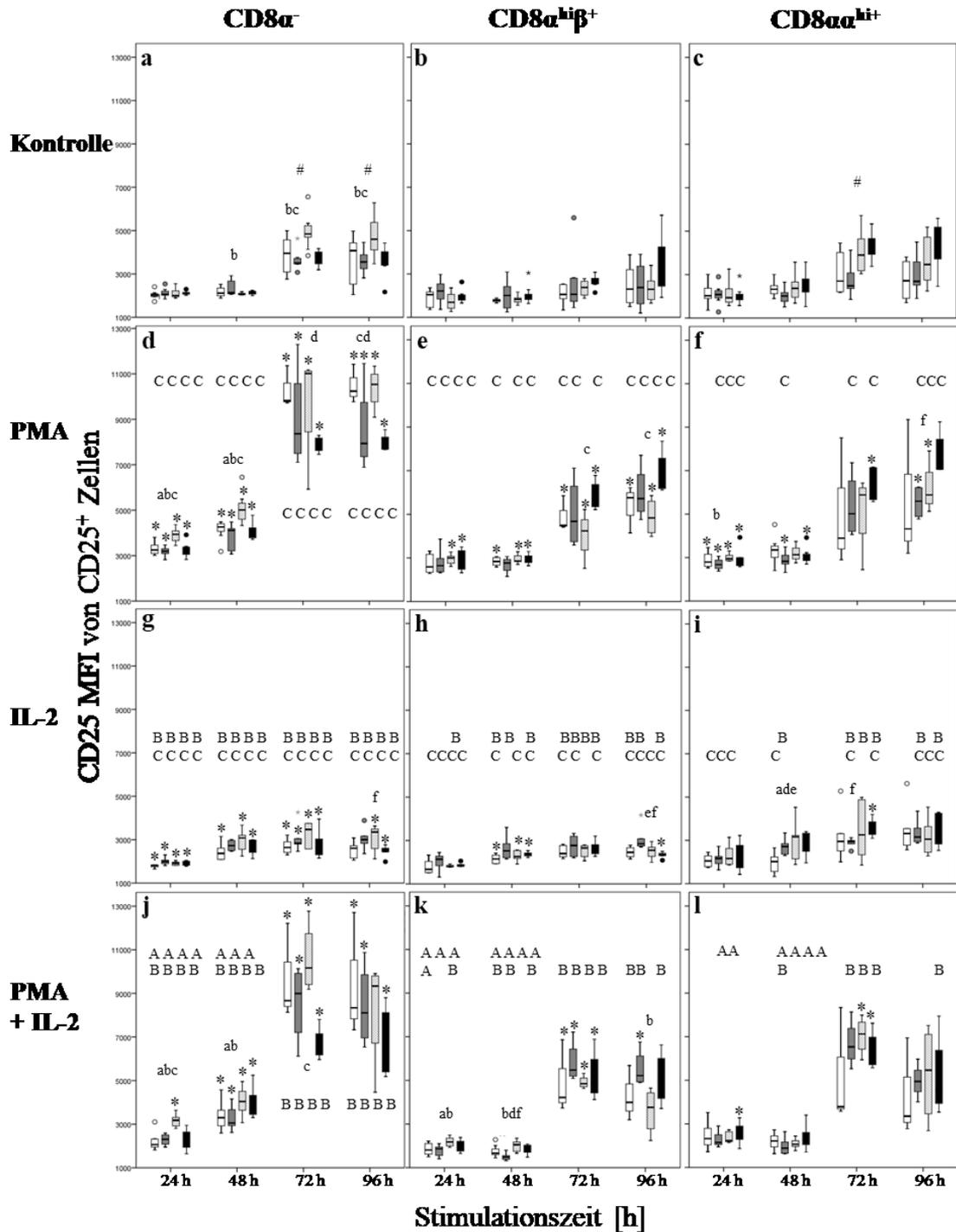


Abb. 6: CD25 Expression gemessen an der MFI jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit PMA, IL-2, oder PMA + IL-2. Kontrollen blieben unstimuliert. Es wurden 4 verschiedenen Hühnerlinien verwendet: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ■ L68. Signifikanzen: *: stimuliert vs. Kontrolle; A: PMA vs. PMA+IL-2; B: IL-2 vs. PMA+IL-2; C: PMA vs. IL-2; &; (in allen Linien) $CD8\alpha^-$ vs. $CD8\alpha^{hi}\beta^+$ und $CD8\alpha^{hi}$. a: R11-WLA; b: R11-BLA; c: R11-L68; d: WLA-L68; e: WLA-BLA; f: BLA-L68. #: (in allen Linien) 48 h vs. 72 h und 96 h.

3. Ergebnisse

3.1.2 Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Wirkstoffen

In unstimulierten PBL Kulturen hat keine Induktion der Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen stattgefunden (Abb. 7a-f).

Die Stimulation mit PMA hatte hingegen nur eine geringfügige Wirkung auf die Proliferationsaktivität der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Im Allgemeinen zeigten weiße Hühner mit hoher Legeleistung (WLA) die am stärksten ausgeprägte Antwort auf PMA Stimulation, die sich am deutlichsten in allen $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen zeigte (Abb. 7g-l).

Die Zellproliferation konnte mit Hilfe des Wachstumsfaktors IL-2 in allen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen und Hühnerlinien induziert werden. Den größten Anteil sich teilender Zellen wiesen $CD25^+CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen auf, der im Vergleich zu $CD8\alpha^-$ $\gamma\delta$ -T-Zellen in allen vier Hühnerlinien an beiden Zeitpunkten signifikant erhöht war (Abb. 7m-r).

Bezüglich der Stimulation mit IL-2 gab es keine großen Unterschiede zwischen den untersuchten Hühnerlinien. Lediglich die $CD25$ negative Population der $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation der WLA Linie zeigte eine deutlich höhere Proliferation als die gleiche Population der übrigen Hühnerlinien (Abb. 7r).

Die gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Interleukin-2 einen stabilisierenden Effekt auf die Erhaltung und das Wachstum von primären aviären $\gamma\delta$ T-Zellen ausübt.

Die kombinierte Stimulation zeigte einzigartige Ergebnisse bezüglich der Induktion der T-Zellproliferation, denn bei allen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen waren signifikant erhöhte Mengen an geteilten Zellen messbar (Abb. 7s-x). Die Effekte waren dabei immer höher als unter Zellkulturbedingungen mit nur einem Stimulus. Zwischen den Hühnerlinien konnten wieder nur marginale Unterschiede festgestellt werden. Die beiden weißen Legehennenlinien, aber vor allem die WLA Linie, zeigte in einigen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen eine signifikant höhere Proliferation als braune Linien (Abb. 7t-w).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass PMA und IL-2 gut geeignet sind um primäre aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen in Kultur zu halten, zu aktivieren und zu vermehren. Die kombinierte Stimulation führt zu additiven Effekten. Positiv hervor zu heben ist, dass Zellen aller getesteten Hühnerlinien sehr ähnlich auf die Stimulation reagierten, was die breite Anwendbarkeit des Systems verspricht.

3. Ergebnisse

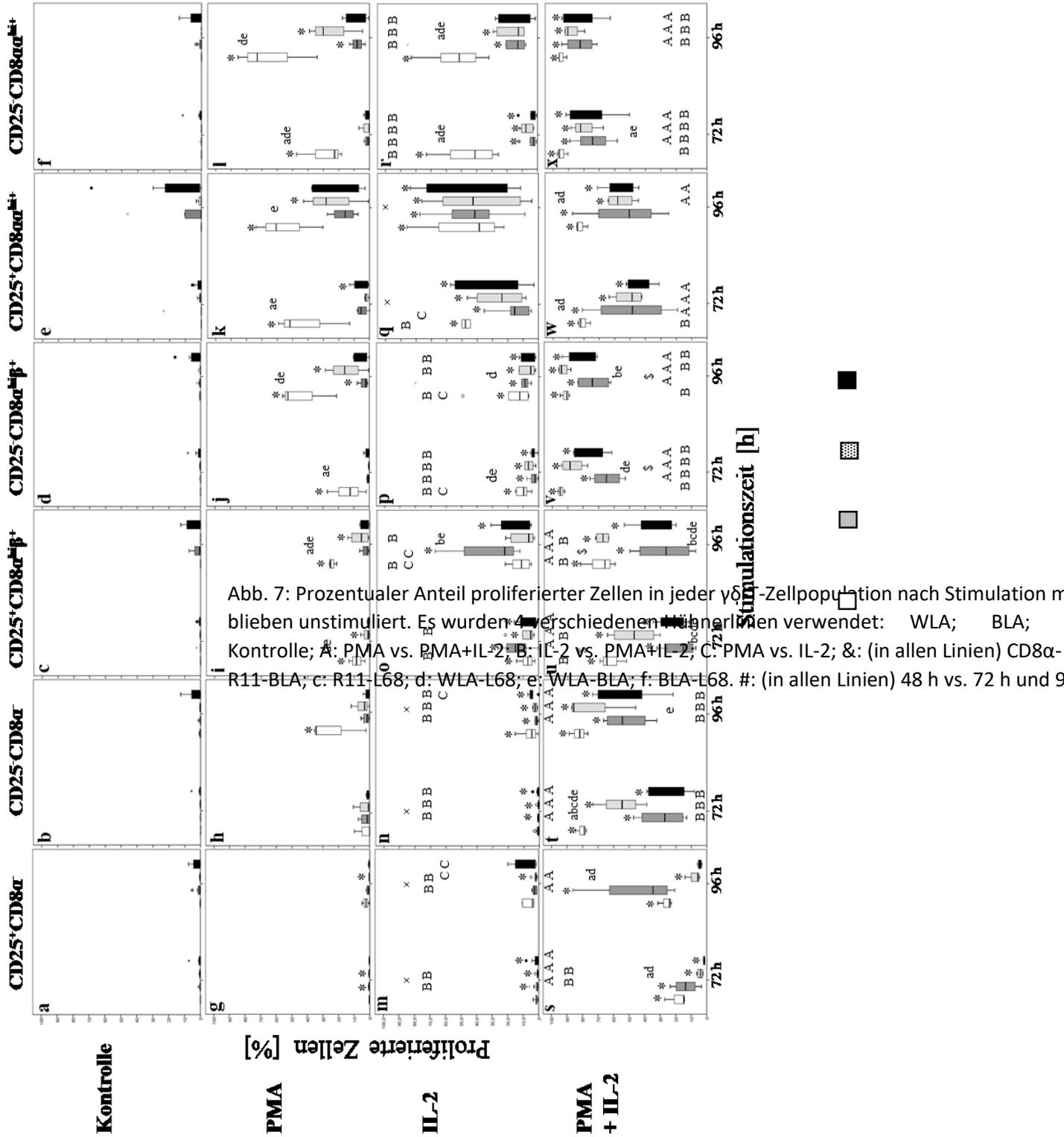


Abb. 7: Prozentualer Anteil proliferierter Zellen in jeder von CD8 α -Zellpopulation nach Stimulation mit PMA, IL-2 oder PMA+IL-2. Die Zellen blieben unstimuliert. Es wurden 4 verschiedenen Zellpopulationen verwendet: WLA; BLA; R11-L68; Kontrolle; A: PMA vs. PMA+IL-2; B: IL-2 vs. PMA+IL-2; C: PMA vs. IL-2; &: (in allen Linien) CD8 α -R11-BLA; c: R11-L68; d: WLA-L68; e: WLA-BLA; f: BLA-L68. #: (in allen Linien) 48 h vs. 72 h und 96 h vs. 72 h.

3. Ergebnisse

3.1.3 Wirkung von Concanavalin A (ConA) und Phytohaemagglutinin (PHA) auf die auf die CD25 Expression und Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen

In der Literatur werden zu Kultivierung und Aktivierung von T Zellen häufig die beiden pflanzlichen Lectine ConA und PHA vorgeschlagen. Beide Substanzen wurden allein und in Kombination mit IL-2 verwendet. Nach Stimulation mit beiden Lectinen kam es zu einer Erhöhung der CD25⁺ Zellen, die jedoch am größten in der CD8 α ⁻ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation ausfiel (Abb. 8a, g). Die CD25-Expressionsintensität blieb jedoch auf CD25⁺ Zellen unverändert zur Kontrolle (Abb. 9). Die kombinierte Stimulation aus Lectin und IL-2 zeigte sehr ähnlich Resultate (Abb. 8d, j). Nur in der CD8 α ^{hi} $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation konnte Proliferation auf einem jedoch nur sehr moderaten Level induziert werden (Abb. 10).

3. Ergebnisse

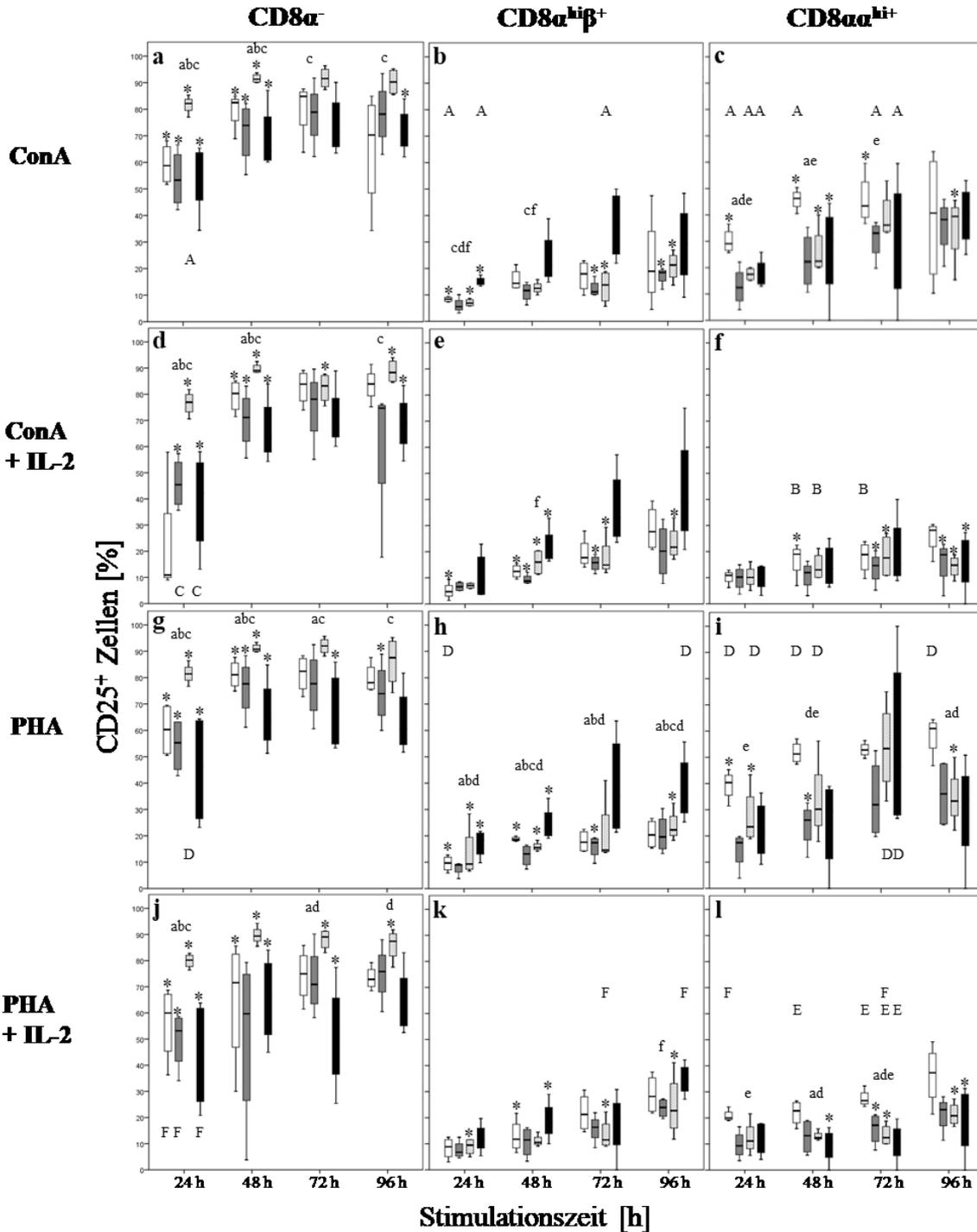


Abb. 8: Prozentualer Anteil CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit ConA, PHA, ConA + IL-2, oder PHA + IL-2. Kontrollen blieben unstimuliert. Es wurden 4 verschiedenen Hühnerlinien verwendet: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ■ L68. Signifikanzen: *: stimuliert vs. Kontrolle; A: PMA vs. PMA+IL-2; B: IL-2 vs. PMA+IL-2; C: PMA vs. IL-2; & (in allen Linien) CD8 α^{-} vs. CD8 $\alpha^{\text{hi}}\beta^{+}$ und CD8 α^{hi} . a: R11-WLA; b: R11-BLA; c: R11-L68; d: WLA-L68; e: WLA-BLA; f: BLA-L68. #: (in allen Linien) 48 h vs. 72 h und 96 h.

3. Ergebnisse

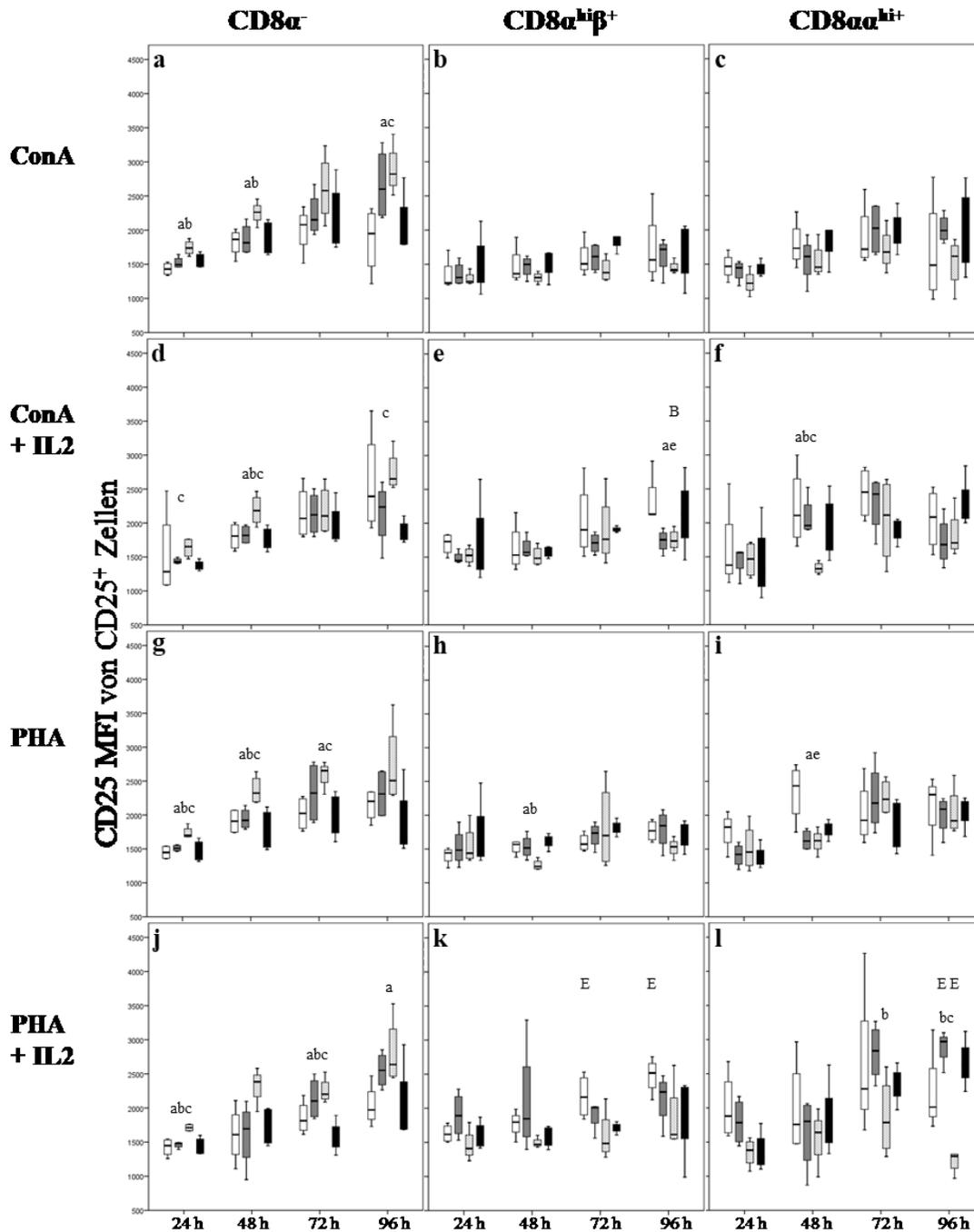
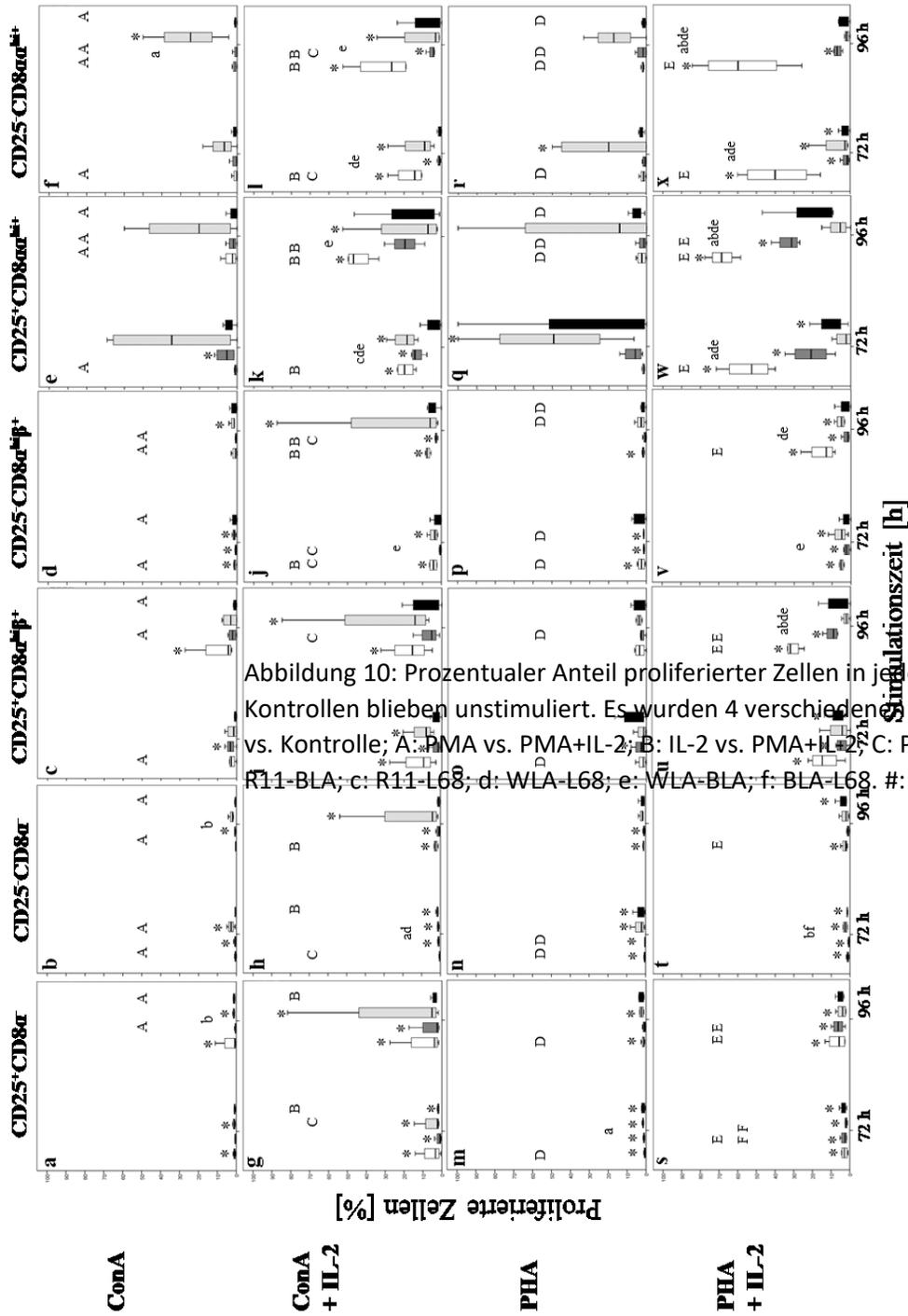


Abb. 9: CD25-Expression gemessen an der MFI jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit ConA, PHA, ConA + IL-2, oder PHA + IL-2. Kontrollen blieben unstimuliert. Es wurden 4 verschiedenen Hühnerlinien verwendet: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ■ L68. Signifikanzen: *: stimuliert vs. Kontrolle; A: PMA vs. PMA+IL-2; B: IL-2 vs. PMA+IL-2; C: PMA vs. IL-2; &: (in allen Linien) $CD8\alpha^-$ vs. $CD8\alpha^{hi}\beta^+$ und $CD8\alpha^{hi}$. a: R11-WLA; b: R11-BLA; c: R11-L68; d: WLA-L68; e: WLA-BLA; f: BLA-L68. #: (in allen Linien) 48 h vs. 72 h und 96 h.

3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

3.2 Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei einer Salmonella Infektion und Entwicklung von Immunität

Um den Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Entwicklung einer Immunität gegen Salmonella-Infektionen zu untersuchen, wurde eine Studie mit immunisierten Eintagsküken durchgeführt. Die Entwicklung des Immunsystems wurde dabei anhand der Messung der absoluten Zahlen von zirkulierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen und deren Subpopulationen studiert. Das Blut der Hühner wurde zwischen dem 8. und 246. Lebenstag mittels spezifischer Antikörperfärbungen durchflusszytometrisch untersucht. Am 24. und 175. Lebenstag wurde bei den bereits immunisierten Tieren eine Booster-Immunsierung durchgeführt (Tab. 3 Abschnitt 2.2.1.3). Es erfolgte dabei stets der Vergleich zwischen der gegen eine *Salmonella* Infektion immunisierten Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe, sowie die Betrachtung der vier verschiedenen Hühnerlinien. In allen Messungen wurden die drei klassischen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen $CD8\alpha^-$, $CD8\alpha^{hi}\beta^+$ und $CD8\alpha^{hi+}$ betrachtet sowie jeweils die Anzahl der $CD25^+$ Zellen von jeder Population.

3.2.1. *in-vivo* $\gamma\delta$ -T-Zellzahlen im peripheren Blut von immunisierten und nicht-immunisierten Küken und Hennen

Die absolute Anzahl der $CD8\alpha^-$ und $CD8\alpha^{hi}\beta^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen war bei immunisierten bzw. geboosterten Tieren im Gegensatz zur Kontrollgruppe nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen am Tag 7 (WLA, R11, L68), 14 (WLA) und 21 (R11) nach Immunisierung signifikant höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe (Abb.: 11a). Küken der Linie WLA zeigten darüber hinaus eine signifikant erhöhte Anzahl $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen am Tag 14 und 16 im Vergleich zu allen anderen untersuchten Hühnerlinien. Im weiteren Verlauf wiesen die Küken der immunisierten Gruppe abfallende Zahlen an $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut auf, die sich denen der Kontrollgruppe annäherten. Jedoch war ein Tag nach der ersten Booster-Immunsierung die Anzahl der $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Hühnern der Linie WLA wieder signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Nach der zweiten Booster-Immunsierung waren hingegen keine Unterschiede bezüglich der Anzahl der $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen mehr messbar.

Die Anzahl der $CD25^+CD8\alpha^-$ und $CD25^+CD8\alpha^{hi}\beta^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen blieb ebenfalls während der gesamten Studie und bei allen Hühnerlinien unverändert (Daten nicht gezeigt). Die $CD25^+CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen waren hingegen in weißen Linien bei immunisierten Tieren im Gegensatz zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Am Tag 7 und 14 nach der Immunisierung zeigten die $CD25^+CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen eine signifikante Erhöhung bei Tieren der WLA Linie (Abb.: 11b). Tiere der Linie R11 zeigten am Tag 21 nach Immunisierung signifikant höhere Zahlen an $CD25^+CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen als die Kontrollgruppe (Abb.: 11b). Der stärkste

3. Ergebnisse

Anstieg der Anzahl der CD25⁺CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen war am 21. Tag nach Immunisierung in WLA Tieren (14-fach) und R11 Tieren (16-fach) messbar. Allgemein wiesen die Hühner der Linie WLA an den meisten Messzeitpunkten verglichen mit allen anderen Linien die höchste Anzahl CD25⁺CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen auf. Die erste Booster-Immunisierung am 24. Lebenstag führte erneut zu einem signifikanten Anstieg der CD25⁺CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen im peripheren Blut von weißen Hennen. Ein Tag und 32 Tage nach dem ersten Booster (1 dp1.b und 32 dp1.b) wiesen Tiere der WLA und R11 Linie wieder signifikant höhere Zahlen an CD25⁺CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen auf (Abb. 11b). Bei erwachsenen Tieren im Alter von 169 Tagen (145 dp1.b) konnte kein Unterschied bezüglich der Anzahl der CD25⁺CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen gefunden werden.

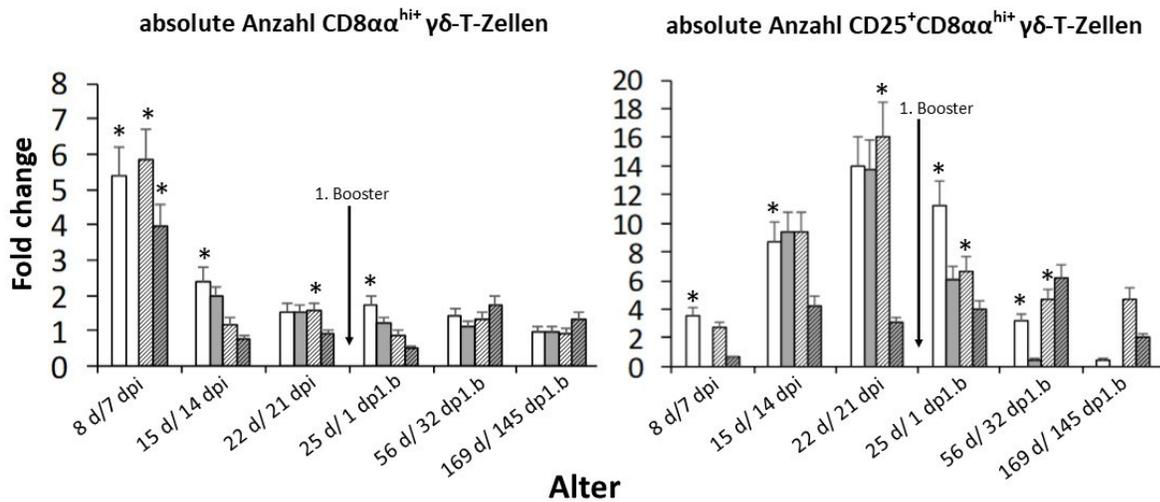


Abb. 11: Veränderungen der absoluten γ δ -Zellzahlen im peripheren Blut von Hühnern. Gezeigt sind die Vollblutmessungen der EDTA Blutproben vom angegebenen Lebenstag bzw. Tag nach SEVac-Behandlung. Fold Change Werte repräsentieren die Veränderungen der absoluten Zellzahlen pro Microliter verglichen zu den Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe. Es werden jeweils alle vier Hühnerlinien gezeigt: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ▩ L68. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.06$) zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Tieren wurden mittels Mann-Whitney U-Test berechnet. *: immunisiert vs. unbehandelt.

3.2.2 Expressionsintensitäten von CD8 α , TCR1, und CD25 auf γ δ -T-Zellen des peripheren Blutes

Die Expressionsstärken der Antigene CD8 α , TCR1 und CD25 auf der Oberfläche der γ δ -T-Zellsubpopulationen wurden durchflusszytometrisch gemessen um mögliche Aktivierungsmuster auf den T-Zellen zu untersuchen, die durch die *Salmonella*-Immunisierung hervorgerufen wurden. Es wurden erneut die CD8 α ⁻, CD8 α ^{hi β +} und CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen analysiert.

Bezüglich der CD8 α ⁻ und CD8 α ^{hi β +} γ δ -T-Zellsubpopulationen konnten ähnlich wie bei den absoluten Zellzahlen keine Unterschiede in der Expressionsintensität zwischen immunisierten und unbehandelten Tieren gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Auf CD8 α ^{hi+} γ δ -T-Zellen der Linien WLA, BLA und R11 war

3. Ergebnisse

die CD8 α -Antigenexpression zwischen Lebenstag 8 und 22 (7 dpi-21 dpi) bei immunisierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 12 a).

Die TCR1-Expression war auf CD8 α^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen am Tag 7 (WLA, R11), 14 (WLA) und 21 (R11) signifikant erhöht im Vergleich zur gleichen Linie der Kontrollgruppe (Abb. 12b). Zudem zeigte sich eine Erhöhung am Tag 32 nach Immunisierung bei den Linien WLA, BLA und R11, sowie am Tag 145 nach dem ersten Booster bei der Linie R11.

Im Gegensatz dazu war die CD25-Expression auf CD25 $^+$ CD8 α^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen der Linie WLA zwischen dem Tag 7 und 21 nach Immunisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Abb.12c).

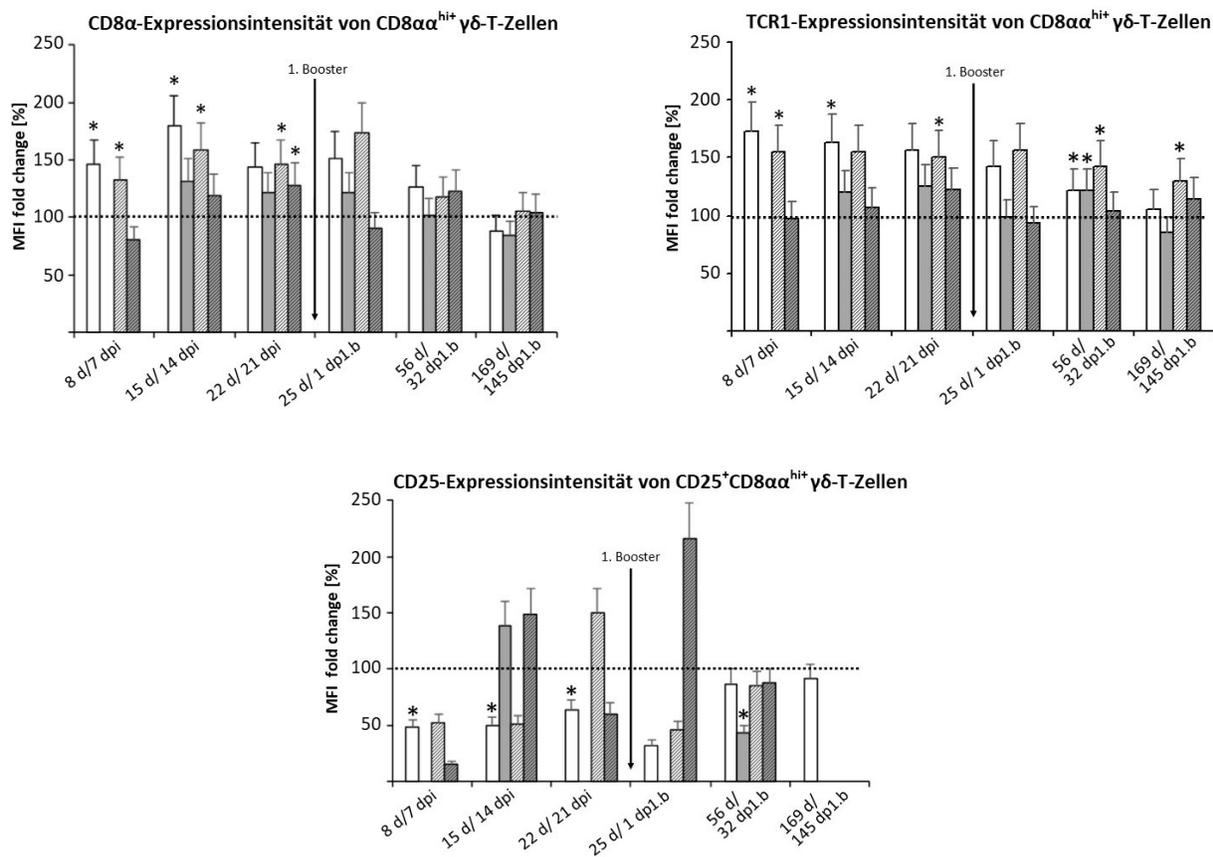


Abb. 12: Veränderung der Expressionsintensitäten verschiedener Antigene auf der Oberfläche von CD8 α^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes. Gezeigt sind die Vollblutmessungen der EDTA Blutproben vom angegebenen Lebenstag bzw. Tag nach SEVac-Behandlung. Fold Change Werte repräsentieren die Veränderungen der Expressionsintensitäten (MFI) von CD8 α und TCR1 auf CD8 α^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen, sowie von CD25 auf CD25 $^+$ CD8 α^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen verglichen zu den Kontrolltieren. Es werden jeweils alle vier Hühnerlinien gezeigt: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ▩ L68. Signifikante Unterschiede (p ≤ 0.06) zwischen der immunisierten Gruppe und der Kontrollgruppe wurden mittels Mann-Whitney U-Test berechnet. *: immunisiert vs. unbehandelt.

3. Ergebnisse

3.2.3 Ex-vivo Re-Stimulation von isolierten Lymphozyten des peripheren Blutes

Um eine mögliche Gedächtnisfunktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Hinblick auf eine Salmonella-Infektion nach Immunisierung zu untersuchen, wurden Lymphozyten der Hühner an verschiedenen Tagen nach der Immunisierung isoliert und *in-vitro* mit Salmonellen des Impfstamms (SEvac) re-stimuliert. Da in vorrangigen Zellkulturversuchen IL-2 als wichtiges Zytokin bestimmt wurde, das zur Erhaltung und Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen in Kultur beiträgt, wurde es stets dem Zellkulturmedium zugesetzt. Die Immunreaktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde anhand ihrer CD25-Expression (Aktivierung) und ihrer Proliferationsaktivität durchflusszytometrisch bestimmt. Zellen der Hühner der Kontrollgruppe dienten als Vergleich, da diese Tiere bisher nicht mit Salmonellen in Kontakt kamen und somit eine Erstreaktion aufweisen sollten. Falls $\gamma\delta$ -T-Zellen als Gedächtniszellen wirken, sollten diejenigen Zellen der immunisierten Tiere stets stärker auf eine Salmonella-Stimulation reagieren als die der Kontrollgruppe.

3.2.3.1 Definition von neuen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen

Bereits bei den ersten Messungen der SEvac-stimulierten Proben der Lymphozyten des peripheren Blutes (*peripheral blood lymphocytes = PBL*) fiel auf, dass die $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation eine erhöhte $CD8\alpha$ -Expression aufwies. Diese wurde bereits in den frisch analysierten EDTA Blutproben gefunden (siehe Absatz oben; Abb. 13a, b). Des Weiteren zeigte die $CD8\alpha^{hi+}$ Population speziell bei Hühnern der WLA Linie eine Tendenz sich in 2 distinkte Populationen zu teilen (Abb. 13c, d). Die Erhöhung der $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation und eine Aufspaltung in weitere Populationen war bei den immunisierten Tieren noch einmal besonders stark ausgeprägt (Abb. 13d). Zudem führte eine Stimulation bzw. Re-Stimulation der PBLs mit SEvac zu einer deutlichen Entwicklung dieser Populationen. Außerdem fiel auf, dass diese neue $CD8\alpha^{hi+}$ Population zusätzlich eine höhere Expression des $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors (TCR1) aufwies. Anhand dieser Beobachtungen wurden die $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen fortan in folgende drei Subpopulationen unterteilt und separat untersucht: $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta+}$ und $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen (Abb. 14).

Überdies hinaus wurde die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation zusätzlich neu definiert. Diese Population zeigte eine schwache Expression des homodimeren $CD8\alpha$ Co-Rezeptor und zusätzlich eine erhöhte TCR1-Expression. Sie trat nach Stimulation der PBL Kulturen vermehrt auf und erreichte vor allem bei den immunisierten Hühnern auswertbare Zellzahlen (Abb. 13d; Abb. 14).

In allen Analysen der stimulierten bzw. re-stimulierten PBL Kulturen wurden daher folgende fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen in allen Hühnerlinien separat betrachtet: $TCR1^+CD8\alpha^-$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$, $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta+}$, $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ und $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$.

3. Ergebnisse

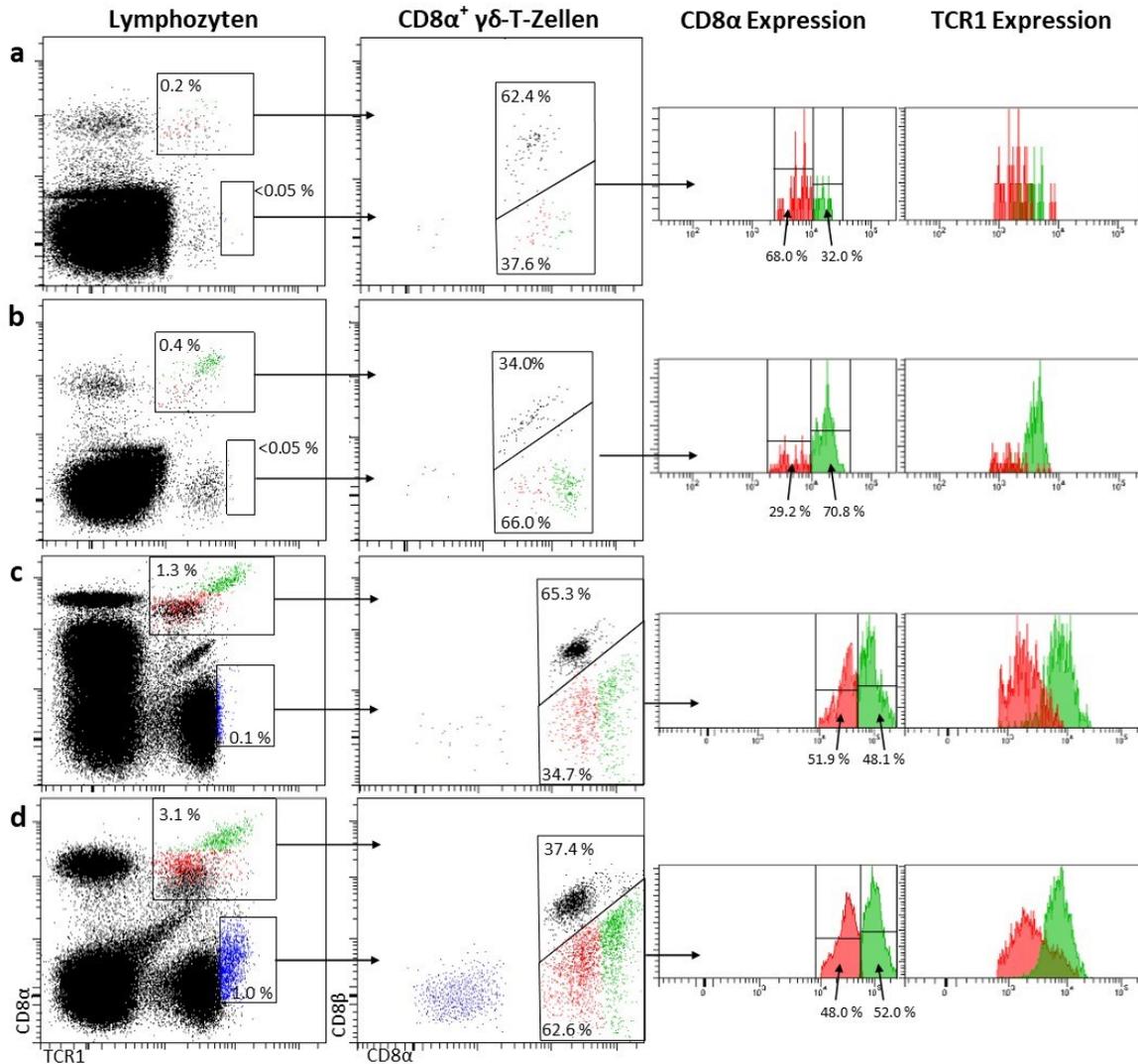


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der PBLs eines repräsentativen Tieres der WLA Linie. Dot Plot Diagramme auf der linken Seite zeigen die 2-Farben FACS Analyse für TCR1 ($\gamma\delta$ TCR) und CD8 α . In der mittleren Reihe sind die eingegrenzten CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen nach ihrer CD8 α und CD8 β Fluoreszenz weiter aufgetrennt. In den Histogrammen rechts ist die Fluoreszenzintensität von CD8 α oder TCR1 auf CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen dargestellt. **a**: Analyse des EDTA Blutes von einem repräsentativen Tier der Kontrollgruppe (22 Tage alt); **b**: Analyse des EDTA Blutes von einem repräsentativen Tier der immunisierten Gruppe (22 Tage alt; 21 dpi); **c**: SEvac-stimulierte PBL Probe eines repräsentativen Tieres der Kontrollgruppe (246 Tage alt); **d**: SEvac-stimulierte PBL Probe eines repräsentativen immunisierten Tieres (246 Tage alt; 71 dp2.b).

3. Ergebnisse

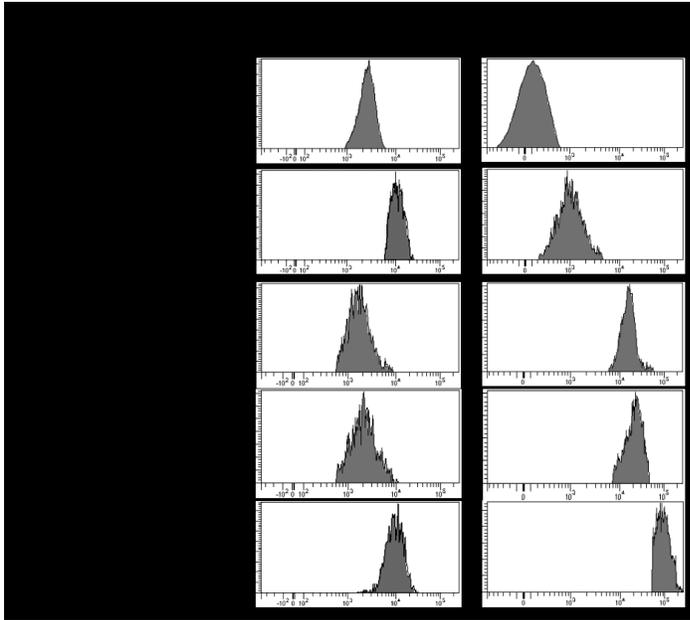


Abb. 14: Fluoreszenzstärke der Oberflächenmarker TCR1 und CD8 α , die zur Charakterisierung der fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen herangezogen wurden. Gezeigt sind die Histogramme der FACS Analyse eines repräsentativen Tieres der WLA Linie.

Da die Schlupfraten der verschiedenen Hühnerlinien sehr unterschiedlich ausfielen, waren nicht an jedem Beprobungszeitpunkt wie ursprünglich geplant 3 Tiere pro Linie vorhanden. Zudem konnten nicht immer suffiziente Lymphozytenzahlen isoliert werden, sodass Proben aus der Zellkultur mitunter nicht auswertbar waren. Die Anzahl der analysierten Proben aus den *ex-vivo* (Re)-Stimulationsversuchen pro Zeitpunkt und Hühnerlinie ist daher in Tabelle 10 (Anhang) als Übersicht dargestellt.

3.2.3.2 CD25-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SEvac-(Re)-Stimulation der PBL

Die Stimulation mit SEvac führte in Lymphozyten-Kulturen der unbehandelten Kontrolltiere zu einem Anstieg der CD25⁺ Zellen in der TCR1⁺CD8 α ^{hi+}, TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} und TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation, der mit einem Anstieg der CD25-Expressionsintensität auf diesen Zellen einherging. Eine SEvac Re-Stimulation der Zellen der immunisierten Hühner führte zu einem schnelleren Anstieg des Anteils CD25⁺ Zellen, die jedoch im Allgemeinen eine niedrigere Expressionsintensität verglichen mit PBL Kulturen der Kontrollgruppe aufwiesen. Diese Beobachtungen erreichten keine statistische Signifikanz und sind daher nicht gezeigt.

3.2.3.3 Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SEvac-(Re)-Stimulation der PBL

Um eine mögliche Gedächtnisfunktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu untersuchen, wurde die Zellteilungsaktivität der fünf verschiedenen Subpopulationen nach der erneuten Konfrontation mit Salmonellen

3. Ergebnisse

durchflusszytometrisch bestimmt. PBL Kulturen der unbehandelten Kontrollgruppe dienten dabei als Vergleich.

Alle $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen aus den PBL Kulturen der jungen Hühner zwischen Lebenstag 15 und 22 zeigten nach SEvac Stimulation eine erhöhte Anzahl proliferierter Zellen, die nach 96 h am stärksten ausgeprägt war (Abb. 15). Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der immunisierten Tiere und denen der unbehandelten Kontrollgruppe.

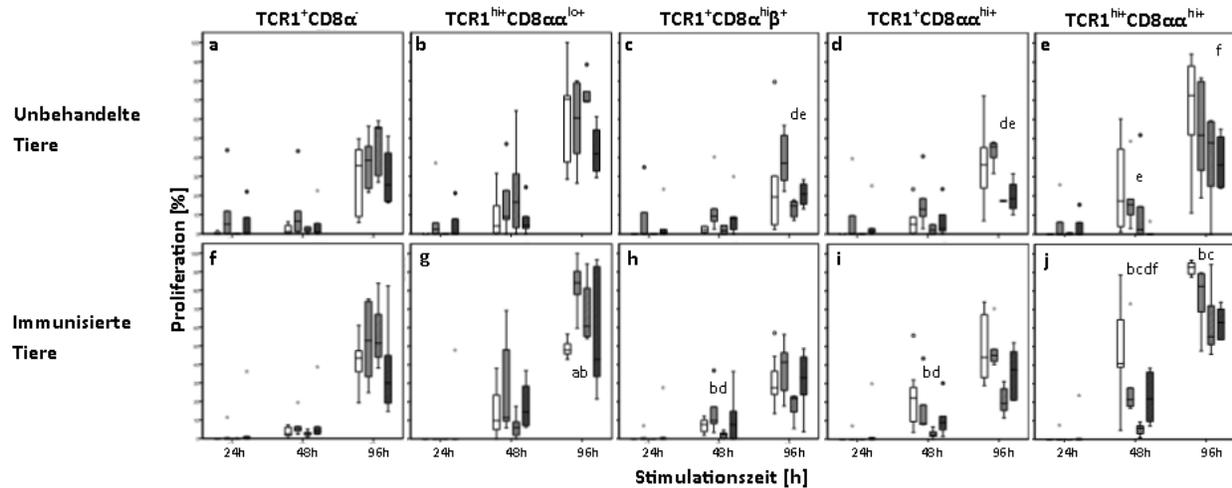


Abb. 15: Anteil proliferierter $\gamma\delta$ -T-Zellen von jungen Küken zwischen Lebenstag 15 und 22. PBL Kulturen von unbehandelten und immunisierten Tieren zwischen Lebenstag 15 und 22 (13 dpi – 20 dpi) wurden mit SEvac (re-)stimuliert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der proliferierten Zellen für jede $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation nach 24, 48 und 96 h ex-vivo SEvac-Stimulation. Es sind alle vier Hühnerlinien gezeigt: □ WLA; ■ BLA; ▨ R11; ▩ L68. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney U-Test berechnet. *: immunisiert vs. unbehandelt. #: IL-2 vs. IL-2 + SEvac. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zwischen den Hühnerlinien wurden mittels student's t-Test berechnet. a: WLA-BLA; b: WLA-R11; c: WLA-L68; d: BLA-R11; e: BLA-L68; f: R11-L68.

In PBL Kulturen der Kontrollgruppe, die nur mit IL-2 stimuliert wurden, zeigten die $\gamma\delta$ -T-Zellen fast keine Zellteilungsaktivität. Nur Zellen der Linie WLA wiesen nach 72 h einen geringen Anteil proliferierter Zellen auf. Eine proliferative Aktivität war zudem, wenn überhaupt, nur in der $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ und der $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach 72 h in allen Linien detektierbar. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen aus den PBL Kulturen der immunisierten Küken verhielten sich sehr ähnlich. Eine messbare Menge an bereits geteilten Zellen war hier jedoch schon nach 48 h Kultur in allen $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen vorhanden (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

3.2.3.4 Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SEvac-Stimulation der PBL von immunisierten und geboosterten Legehennen

Die Gedächtniskapazität der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach erneutem Kontakt mit Salmonellen wurde bei erwachsenen Legehennen abermals untersucht. Die Tiere wurden, wie in Tabelle 3 gezeigt, am Lebenstag 24 und 175 booster-immunisiert, um eine vollständige Immunität gegen eine Salmonella Infektion zu erreichen. Im Alter von 246 Tagen (71 dp2.b) wurden erneut PBL isoliert und *ex-vivo* mit SEvac re-stimuliert. Beide TCR1^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen der Tiere der immunisierten Gruppe wiesen dabei eine signifikant stärkere Proliferation als gleiche Zellen der Kontrollgruppe auf (Abb. 17g, j). Die TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Zellen der WLA Linie zeigten nach 24 h SEvac-Re-Stimulation bereits einen einzigartigen Anteil von schon einmal geteilten Zellen (Abb.: a unten). Zum Vergleich zeigten dieselben Zellen der Tiere der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt noch keine Zellteilung (Abb. 16a oben; Abb. 17e, j). Das Weitern wiesen die Hühner der weißen Linien signifikant höhere Anteile von proliferierten TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen ($p \leq 0.05$) nach 48 h (WLA und R11) und 72 h (R11) SEvac Stimulation auf (Abb. 17i). Nach 72 h SEvac-stimulierter Kultur zeigten die TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen der immunisierten und geboosterten WLA Linie bis zu 8 Zellteilungen und eine bis zu 8-fache Vermehrung dieser Population, wohingegen die Zellen der Kontrollgruppe nach Stimulation nur 4 Zellteilungen und eine insgesamt zweifache Vermehrung aufwiesen (Abb.: 16 b).

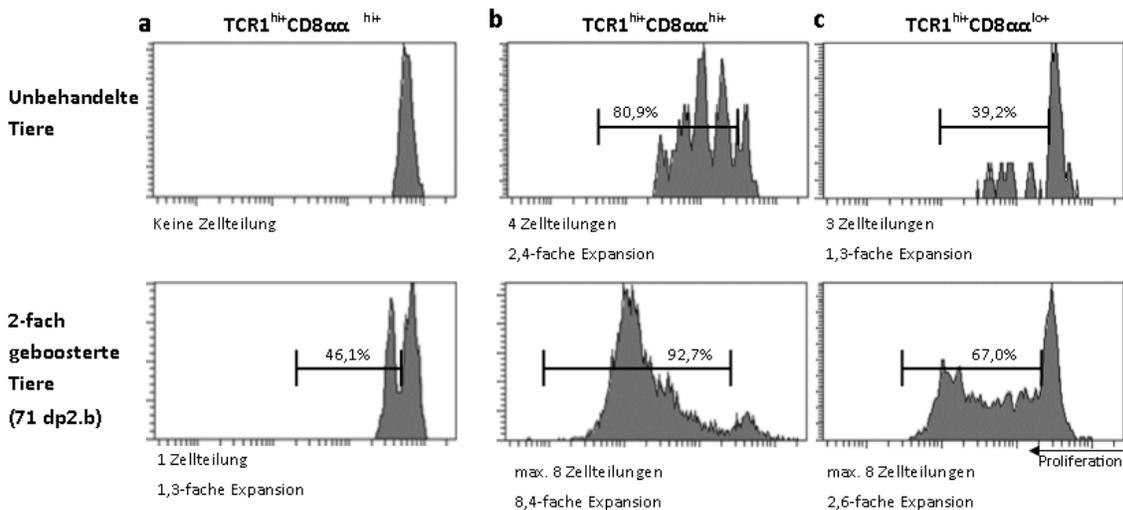


Abb. 16: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen. Gezeigt sind die FACS Analysen der stimulierten PBL Kulturen von jeweils einem repräsentativen Tier der WLA Linie. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität des Proliferationsfarbstoffes. Die Peaks mit abnehmender Fluoreszenz repräsentieren bereits geteilte Zellen der TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Subpopulation nach 24 h (a) und 72 h (b) und der TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} Population nach 72 h (b) SEvac-stimulierter Kultur.

3. Ergebnisse

Die TCR1^{hi}CD8α^{lo+} γδ-T-Zellsubpopulation der immunisierten Tiere zeigte ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl proliferierter Zellen nach 48 h (alle Hühnerlinien) und 72 h (weiße Linien) SEvac-stimulierter Kultur (Abb.: 17 b, g). Zudem wiesen TCR1^{hi}CD8α^{lo+} Zellen der immunisierten und geboosterten WLA Linie nach 72 h bis zu 8 Zellteilungen und eine 2,5-fache Vermehrung als Reaktion auf die SEvac Stimulation. Dieselben Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe wiesen hingegen nur drei Zellteilungen im gleichen Zeitraum auf (Abb. 16 c).

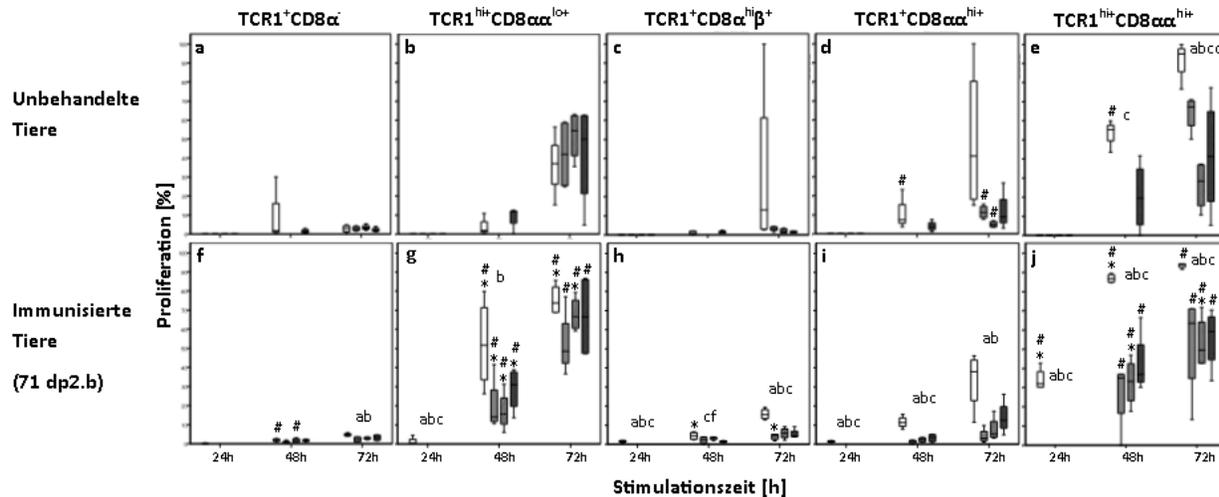


Abb. 17: Anteil proliferierter γδ-T-Zellen von Legehennen am Lebenstag 246 (71 dp2.b). PBL Kulturen von unbehandelten und immunisierten Tieren wurden mit SEvac (re)-stimuliert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der proliferierten Zellen für jede γδ-T-Zellsubpopulationen nach 24, 48 und 72 h *ex-vivo* SEvac-Stimulation. Es sind alle vier Hühnerlinien gezeigt: □WLA; ■BLA; ▨R11; ▩L68. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney U-Test berechnet. *: immunisiert vs. unbehandelt. #: IL-2 vs. IL-2 + SEvac (Daten nicht gezeigt). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zwischen den Hühnerlinien wurden mittels student's t-Test berechnet. a: WLA-BLA; b: WLA-R11; c: WLA-L68; d: BLA-R11; e: BLA-L68; f: R11-L68.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass es altersabhängige Unterschiede in der Immunantwort der γδ-T-Zellen gegen eine *Salmonella* Infektion gibt. In frisch geschlüpften Küken sowie jungen Tieren scheint die T-Zellantwort zwar stark, aber wenig spezifisch. Erst bei erwachsenen Legehennen beschränkt sich die Aktivierung und klonale Expansion der γδ-T-Zellen auf die CD8α⁺ Subpopulationen, die scheinbar eine besondere Funktion bei der *Salmonella* Infektion einnehmen. Vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe deuteten ebenfalls auf eine besondere Rolle dieser Zellen hin.

Bezüglich der untersuchten Hühnerlinien, die sich in Legeleistung und Phylogenie unterscheiden, wurden keine gravierenden Unterschiede gefunden. Dennoch scheinen weiße Linien eine stärkere systemische Immunreaktion gegen eine *Salmonella* Infektion zu entwickeln, die im peripheren Blut messbar ist. Eine

3. Ergebnisse

besondere Stellung nimmt die WLA Linie ein, die stets eine besonders ausgeprägte Proliferation der CD8 α ⁺ γ δ -T-Zellpopulationen aufweist.

3.2.3.5 Zytokinexpression der γ δ -T-Zellen nach SEvac-Re-Stimulation der PBL Kulturen immunisierter und geboosterter Legehennen

Um die immunologischen Funktion der aviären γ δ -T-Zellen genauer zu untersuchen, wurde die mRNA Expression verschiedener Zytokine und Zytokinrezeptoren mittels quantitativer *real-time* RT-PCR analysiert. Es wurden wieder unbehandelte erwachsene Legehennen mit denen verglichen, die immunisiert und zweimal booster-immunisiert wurden (siehe Tab. 3). Am Tag 3, 6 und 17 nach der zweiten Booster-Immunsierung wurden isolierte PBLs mit SEvac stimuliert bzw. re-stimuliert und die gesamte γ δ -T-Zellpopulation nach 24 und 48 h Kultur mittels Magnet-Bead Separation isoliert. Aus den reinen γ δ -T-Zellen wurde RNA isoliert und analysiert.

In γ δ -T-Zellen der immunisierten WLA Linie war die IFN- γ mRNA Transkription nach 24 und 48 h SEvac stimulierter Kultur an allen getesteten Zeitpunkten signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 18). Zudem wiesen die γ δ -T-Zellen der WLA Linie nach 24 h Stimulation immer ein signifikant höheres IFN- γ mRNA Transkriptionslevel auf als alle anderen Hühnerlinien. In allen übrigen Hühnerlinien (BLA, R11 und L68) waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IFN- γ Expression zwischen den Versuchsgruppen detektierbar.

Bei allen anderen untersuchten Zytokinen wie TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-17 und IL-21 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Auch die Zytokinrezeptoren IL-2R α , IL-7R α , IL-15R α und IL-21R zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem mRNA Transkriptionslevel nach SEvac Stimulation zwischen unbehandelten und zuvor immunisierten Hühnern. Die Daten werden daher nicht gezeigt.

3. Ergebnisse

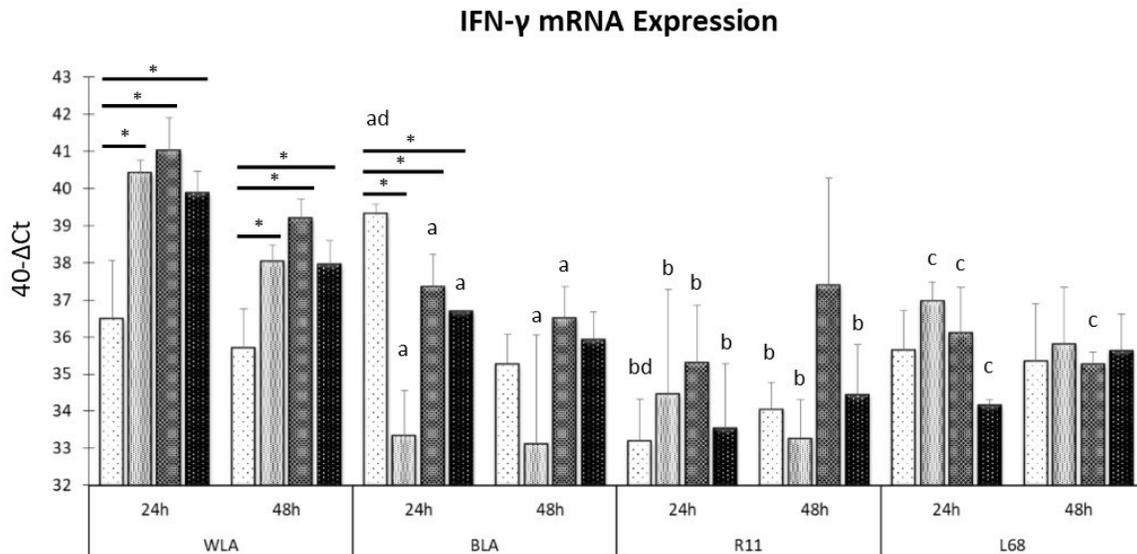


Abb. 18: IFN- γ mRNA Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen immunisierter vs. unbehandelter Tiere. Gezeigt ist die Veränderung des IFN- γ mRNA Transcriptionslevels der gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen nach 24 h und 48 h SEvac-stimulierter Kultur normalisiert auf GAPDH. Es wurden drei verschiedene Zeitpunkte nach der zweiten Booster-Immunisierung untersucht: 3 Tage nach dem zweiten Booster; 6 Tage nach dem zweiten Booster; 17 Tage nach dem zweiten Booster; unbehandelte Kontrolltiere. Gezeigt sind alle vier Hühnerlinien. WLA, BLA, R11 und L68. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney U-Test berechnet. *: immunisiert vs. unbehandelt. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zwischen den Hühnerlinien wurden mittels student's t-Test berechnet. a: WLA-BLA; b: WLA-R11; c: WLA-L68; d: BLA-R11.

3. Ergebnisse

3.3 Funktionelle Analysen der fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SE-Stimulation der PBL von WLA Hühnern

Im letzten Teil des Projekts sollten die Funktionen der einzelnen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen im Kontext einer *Salmonella*-Infektion genauer untersucht werden. Da Zellen der weißen Legehennen mit hoher Legeleistung (WLA Linie) in den bisherigen Versuchen die ausgeprägteste Reaktion zeigten und alle fünf neu definierten $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen in höheren Anteilen besaßen, wurde sich in allen weiteren funktionellen Studien nur auf diese Linie beschränkt. Des Weiteren wurde in diesen Versuchen mit einem *Salmonella enterica* serovar Enteritidis gearbeitet, da dieser im Gegensatz zum zuvor benutzten Impfstamm (SEvac) ein Wildstamm ist.

3.3.1 Proliferative Aktivität der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach SE-Stimulation

Einen ersten Hinweis auf die Funktion einer T Zelle gibt ihre Expansionskapazität nach dem Zusammentreffen mit einem körperfremden Antigen. Diese Eigenschaft lässt sich mittels spezifischer Färbung mit einem Proliferationsfarbstoff und der durchflusszytometrischen Analyse schnell und einfach messen. Die isolierten PBL wurden dazu also direkt nach der Isolation mit dem Proliferationsfarbstoff markiert und *in-vitro* mit Salmonellen stimuliert (MOI 0,1). Nach 10 min Kultur wurde das Antibiotikum Gentamycin hinzu gegeben um die Vermehrung der Bakterien zu stören. Nach 72 h stimulierter Kultur wurde die Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen gemessen. Um ein genaues Abbild der Zellteilungsaktivität zu erhalten, wurden der Proliferationsindex sowie der Anteil der geteilten Zellen berechnet.

Mittels spezifischer Antikörperfärbungen und der zuvor etablierten Gating-Strategie wurden alle fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen separat analysiert. Die $TCR1^+CD8\alpha^-$ Population, die den Großteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen ausmacht, zeigte so gut wie keine Zellteilungsaktivität nach der Stimulation mit Salmonellen. Auch die IL-2 stimulierten Kontrollen zeigten keine Proliferation. Die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ Zellen enthielt ebenfalls nur einen sehr kleinen Anteil von etwa 10 % reagierender Zellen. Diese proliferierende Fraktion zeigte jedoch eine durchschnittliche Zellteilungsrate von 1,63 (Tab. 7) und bestand voranging aus $CD25^{hi+}$ Zellen. Zudem proliferierte diese Population signifikant mehr als die nahe verwandten $TCR1^+CD8\alpha^-$ $\gamma\delta$ -T-Zellen. $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta^+}$ Zellen zeigten ebenfalls keine hohe Proliferation. Die stärkste Expansion nach der Stimulation mit Salmonellen wiesen die $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen auf. $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$ Zellen hatten eine signifikant höhere Proliferationsrate als $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta^+}$ und $TCR1^+CD8\alpha^-$ $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tab. 7). Dennoch proliferierte nur ein relativ kleiner Anteil von rund 18 % der Gesamtpopulation. Jede Zelle teilte sich rund 2,5-mal innerhalb von 72 h. Die stärkste Zellteilung zeigte die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ Population, in der

3. Ergebnisse

58-72 % der Zellen in Teilung gingen und sich innerhalb von 72 h ebenfalls durchschnittlich 2,5-mal teilen (Tab. 7). Diese Population hob sich damit signifikant von TCR1⁺CD8 α ⁻, TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} und TCR1⁺CD8 α ^{hi} β ⁺ γ δ -T-Zellen ab.

Tab. 7: Proliferationsparameter der γ δ -T-Zellsubpopulationen nach 72 h unter dem Einfluss von Salmonellen. Dargestellt sind der Proliferationsindex (PI) und der prozentuale Anteil proliferierender Zellen für jede Subpopulation. Die Buchstaben a-e repräsentieren die statistische Signifikanz dieser Parameter zwischen den einzelnen γ δ -T-Zellsubpopulationen. Sternchen repräsentieren einen signifikanten Unterschied zwischen Kulturen mit Salmonellen und den Kontrollen, die nur mit IL-2 supplementiert wurden.

$\gamma$$\delta$-T-Zellpopulation	Proliferationsindex (PI)	proliferierende Zellen [%]	Signifikanz (p ≤ 0,05)
a) TCR1 ⁺ CD8 α ⁻	1,13 ± 0,11	1,08 ± 0,66	b, d, e
b) TCR1 ^{hi+} CD8 α ^{lo+}	1,63 ± 0,21	8,19 ± 6,11	a, e
c) TCR1 ⁺ CD8 α ^{hi} β ⁺	1,49 ± 0,42	4,16 ± 5,00	d, e
d) TCR1 ⁺ CD8 α ^{hi+}	2,26 ± 0,45 *	11,46 ± 6,95 *	a, c
e) TCR1 ^{hi+} CD8 α ^{hi+}	2,22 ± 0,50 *	64,96 ± 7,42 *	a,b,c

3.3.2 Dynamik der Antigenexpression auf γ δ -T-Zellsubpopulationen

Um einen besseren Einblick in die Dynamik der Expression von CD25, CD44 und MHC-II zu erhalten, wurden diese Marker nach IL-2 und SE-Stimulation über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine Analyse im Verhältnis zur Proliferation gelegt, da die Zellen während ihrer Teilungen vermutlich einen Differenzierungsprozess durchlaufen.

3.3.2.1 CD25-Expression auf γ δ -T-Zellsubpopulationen

Die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) wurde nach 24, 48, 72, 96 und 120 h Kultur mit und ohne Salmonellen auf allen fünf γ δ -T-Zellsubpopulationen untersucht. Als Kontrolle dienten wieder die Kulturen, die nur mit IL-2 supplementiert wurden. Der Prozentuale Anteil CD25⁺ Zellen war bereits nach 24 h auf TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} Zellen und nach 24 und 48 h auf TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Den höchsten Anteil CD25⁺ Zellen wiesen wiederum die TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} Zellen während der fünftägigen Kultur auf. Wenn auch CD25 schwach positive Zellen dazu gezählt wurden, war diese Population fast vollständig CD25 positiv (Abb. 23). Jedoch gab es hierbei keinen Unterschied zwischen der nur mit IL-2 behandelten Kontrolle und den Zellkulturen, in denen sich Salmonellen befanden. Auch die

3. Ergebnisse

übrigen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen wiesen kaum Salmonella-induzierte Unterschiede in ihrer CD25 Expression auf.

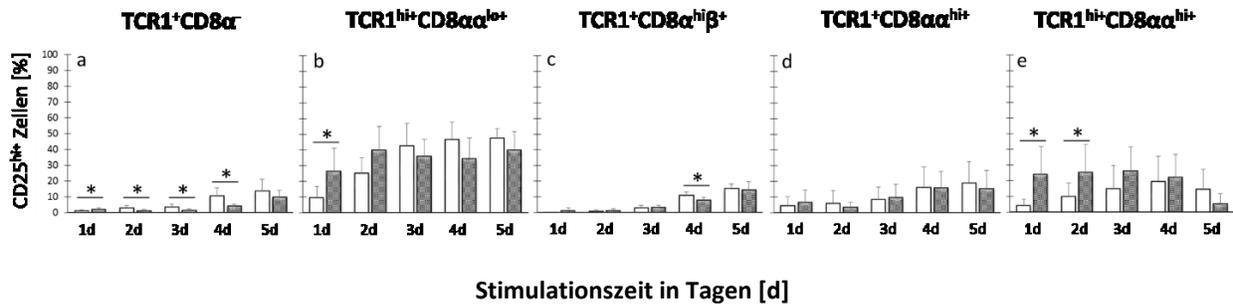


Abb. 19: Prozentualer Anteil CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen IL-2 \pm SE-stimulierter Kultur. Weiße Balken zeigen die Kontrollen (nur mit IL-2 supplementiert) und graue Balken die Daten der IL-2 + SE behandelten Proben. Signifikante Unterschiede (* = $p \leq 0.05$) zwischen den Behandlungen wurden mittels studentischem t-Test berechnet.

Um einen besseren Einblick in die Dynamik der CD25-Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu erhalten, wurde die CD25-Expressionsintensität (MFI) für jede neue Zellgeneration im Verlauf der Proliferation separat analysiert. Dazu wurden nur die stark proliferierenden $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen betrachtet. Die CD25-Expression war verglichen mit der sich nicht teilenden Fraktion in der ersten Tochtergeneration immer erhöht (Abb. 20). In der TCR1^{hi}+CD8 α ^{lo}+ Population setzte sich diese Erhöhung bis zur dritten Generation fort und nahm im späteren Verlauf wieder ab. Die TCR1+CD8 α ^{hi}+ Zellen zeigten eine sehr ähnliche Dynamik. Die CD25-Expression stieg deutlich innerhalb der ersten 2 Zellteilungen an bevor sie abfiel und ein ähnliches Niveau wie die ungeteilte Zellfraktion erreichte (Abb. 20). TCR1^{hi}+CD8 α ^{hi}+ Zellen wiesen ebenfalls die gleiche Dynamik in ihrer CD25-Expression auf, jedoch war die Erhöhung niemals statistisch signifikant, da die Zellen der verschiedenen Tiere sehr unterschiedlich reagierten. In den PBL Kulturen der meisten Tiere proliferierte diese Population immer sehr stark, in anderen gingen nur die CD25^{hi} Zellen in Mitose. Allgemein zeigte die TCR1^{hi}+CD8 α ^{lo}+ Population tendenziell stets die höchste CD25-Expression unter den drei tiefer untersuchten $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen.

3. Ergebnisse

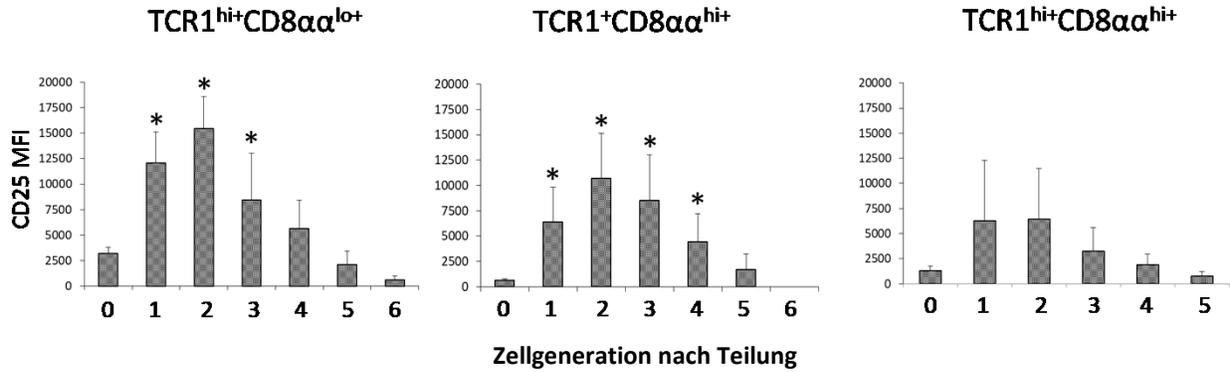


Abb. 20: CD25-Expressionsintensität (MFI) der TCR1^{hi+}CD8α^{lo+}, TCR1⁺CD8α^{hi+} und TCR1^{hi+}CD8α^{hi+} Zellen in jeder durch Teilung entstandenen Zellgeneration (1-6) und der ungeteilten Fraktion (0) in *Salmonella* stimulierten Kulturen. Signifikante Unterschiede (* = p ≤ 0.05) der neu entstandenen Generation zur ungeteilten Fraktion wurden mittels studentischem t-Test berechnet.

3.3.2.2 MHC-II-Expression auf γδ-T-Zellsubpopulationen

Die Expression von MHC Klasse II Molekülen ist in der Literatur mehrfach für humane und auch bovine γδ-T-Zellen beschrieben (Holling et al., 2004; Guzman et al., 2012). Die Expression solcher Moleküle spricht für die Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Auf primären aviären γδ-T-Zellen wurde es in dieser Arbeit vor allem auf CD8α⁺ Populationen gefunden. Interessanterweise erfolgte die Expression in einem umgekehrten Muster zu CD25 (Abb. 23). Die CD8α^{hi+} γδ-T-Zellsubpopulationen (TCR1⁺CD8α^{hi+} und TCR1^{hi+}CD8α^{hi+}) zeigten einen signifikanten Anstieg MHC-II⁺ Zellen beginnend nach 48 h SE-stimulierter Kultur (Abb. 21d, e). Die TCR1^{hi+}CD8α^{hi+} Population wies dabei den höchsten Anteil MHC-II⁺ Zellen mit fast 90 % nach 5 Tagen Kultur auf (Abb. 21e).

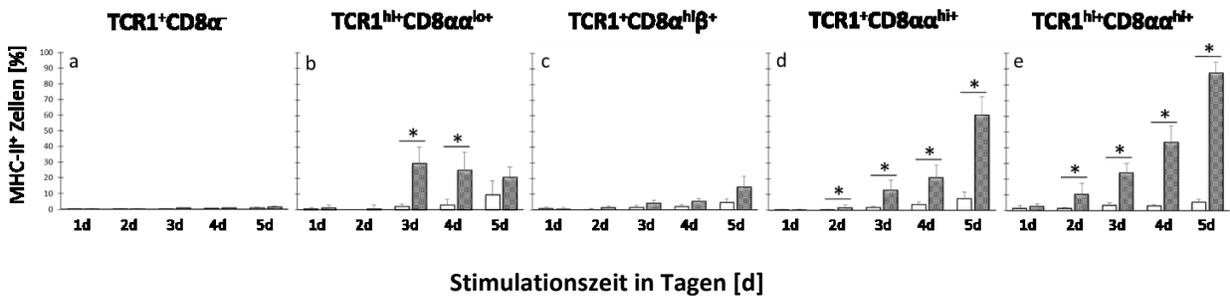


Abb. 21: Prozentualer Anteil MHC-II⁺ Zellen in jeder γδ-T-Zellsubpopulation nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen IL-2 ± SE-stimulierter Kultur. Weiße Balken zeigen die Kontrollen (nur mit IL-2 supplementiert) und graue Balken die Daten der IL-2 + SE behandelten Proben. Signifikante Unterschiede (* = p ≤ 0.05) zwischen den Behandlungen wurden mittels studentischem t-Test berechnet.

3. Ergebnisse

TCR1⁺CD8 α ^{hi} Zellen hatten sehr ähnliche Werte. Die TCR1^{hi}CD8 α ^{lo} Subpopulation wies ebenfalls einen signifikanten Anstieg MHC-II⁺ Zellen nach 72 und 96 h auf, jedoch war dieser im Allgemeinen sehr viel niedriger als bei den CD8 α ^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen. Nur eine Stimulation mit Salmonellen führte zur Expression von MHC-II, wohingegen die Zellen der Kontrollen so gut wie keine Expression dieses bedeutenden Moleküls entwickelten. TCR1⁺CD8 α ⁻ und TCR1⁺CD8 α ^{hi} β ⁺ Zellen zeigten hingegen nur einen sehr kleinen bis gar keinen Anteil MHC-II⁺ Zellen (Abb. 21a, c).

3.3.2.3 CD44-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen

CD44 wird in der T-Zellimmunologie als Marker für Aktivierung aber auch Gedächtnisfunktionen benutzt. Dieses Molekül wird von allen untersuchten aviären $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen auf einem niedrigen Level exprimiert, wobei die höchsten prozentualen Anteile deutlich positiver Zellen wieder auf den CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen gefunden wurden (Abb. 22b, d, e). Die TCR1^{hi}CD8 α ^{lo} Zellen wiesen einen signifikanten Anstieg CD44⁺ Zellen nach 48 und 96 h SE-stimulierter Kultur auf (Abb. 22b). Die CD8 α ^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen zeigten ebenfalls hohe Anteile CD44⁺ Zellen, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den SE-stimulierten Kulturen (Abb. 22d, e). Es gab zudem keinen signifikanten Unterschied in der CD44-Expressionsintensität auf CD44⁺ Zellen zwischen IL-2 allein stimulierten Proben und welchen mit Salmonellen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wiesen alle proliferierenden Zellen eine CD44-Expression auf, wohingegen die ungeteilten Fraktionen größtenteils aus CD44⁻ Zellen bestanden (Abb. 23). Dies erklärt auch das Fehlen von größeren Anteilen CD44⁺ Zellen in der TCR1⁺CD8 α ⁻ und TCR1⁺CD8 α ^{hi} β ⁺ Population, da diese Zellen kaum proliferierten.

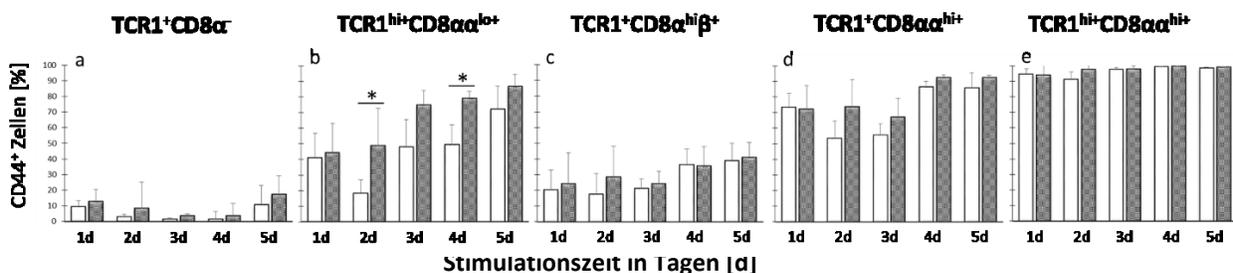


Abb. 22: Prozentualer Anteil CD44⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen IL-2 \pm SE-stimulierter Kultur. Weiße Balken zeigen die Kontrollen (nur mit IL-2 supplementiert) und graue Balken die Daten der IL-2 + SE behandelten Proben. Signifikante Unterschiede (* = $p \leq 0.05$) zwischen den Behandlungen wurden mittels studentischem t-Test berechnet.

3. Ergebnisse

Zusammen gefasst zeigten vor allem die $CD8\alpha^+ \gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen eine interessante dynamische Expression von allen drei Zelloberflächenmarkern. Kurz nach der Salmonella Stimulation begannen die Zellen mit der Expression von CD25, waren aber noch negativ für CD44 und MHC-II (Abb. 23). Eine simultane CD25- und CD44-Expression scheint kennzeichnend für einen hoch aktivierten Phänotyp zu sein, der kritisch ist um die klonale Expansion zu starten. Im Zuge der Proliferation regulieren die Zellen CD25 wieder herunter, bleiben jedoch $CD44^+$ (Abb. 23). Nach einigen Teilungen sind die Zellen somit wieder $CD25^-$ oder $CD25^{lo+}$, fangen aber an MHC Klasse II zu exprimieren (Abb. 23). Am Tag 5 nach dem Zusammentreffen mit Salmonellen könnten die Zellen anhand der gewonnen Ergebnisse also *Salmonella*-spezifische $CD25^-CD44^+MHC-II^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen sein. Endgültige Aussagen über den Differenzierungsstatus und die spezifischen Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen lassen sich jedoch nur anhand von Oberflächenantigenen nicht treffen.

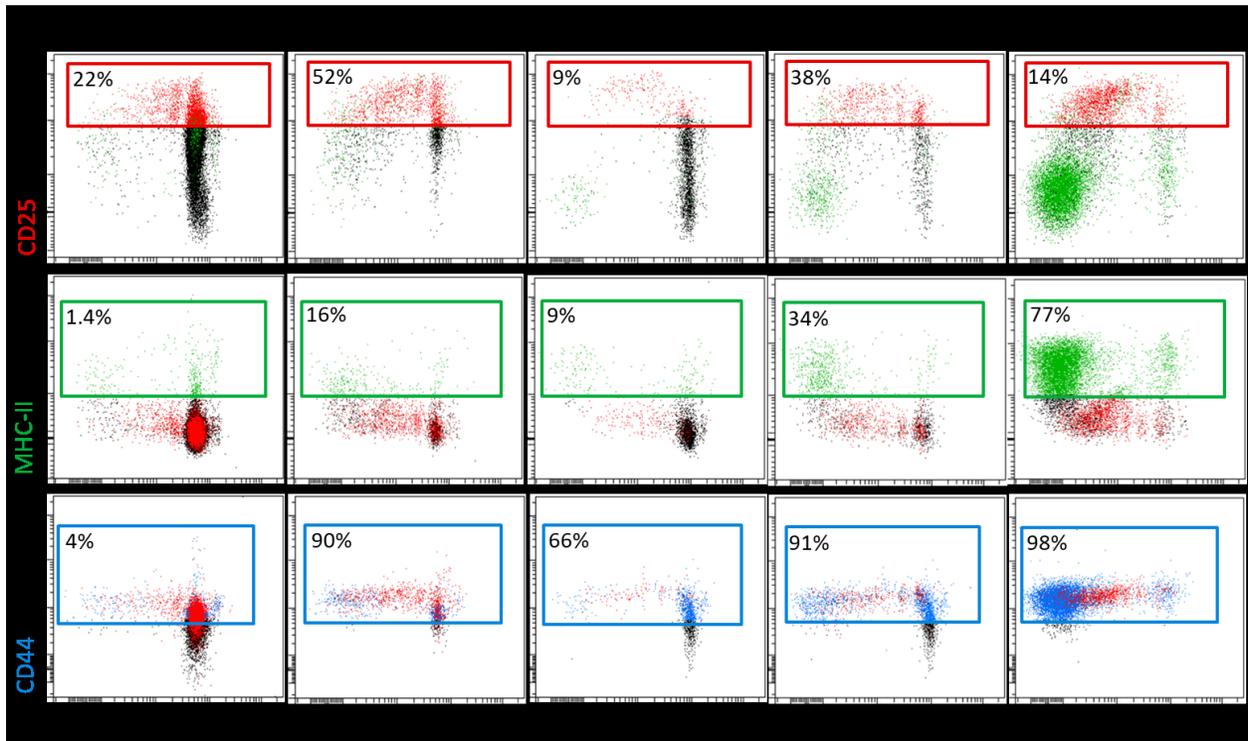


Abb. 23: Durchflusszytometrische Analyse der drei Zelloberflächenproteine CD25, MHC-II und CD44 im Vergleich zur Proliferation nach 5 Tagen SE-stimulierter Kultur der PBLs. Gezeigt sind repräsentative Dot Plots der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen von einer Legehennen der Linie WLA. $CD25^+$ Zellen (rot) und $MHC-II^+$ Zellen (grün) oder $CD25^+$ und $CD44^+$ (blau) werden jeweils zusammen in einem Bild dargestellt. Der Prozentuale Anteil der positiven Zellen für jedes Antigen ist ebenfalls jeweils angezeigt.

3. Ergebnisse

3.3.2.4 Dynamik der CD8 α - und TCR1-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen im Verlauf der Proliferation

Um einen besseren Einblick in den Differenzierungsprozess der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen zu erhalten, wurde ebenfalls die Expressionsintensität (MFI) der Rezeptoren TCR1 und CD8 α im Verlauf der Proliferation analysiert. Dazu wurden wieder nur die drei stark proliferierenden $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen betrachtet. Die TCR1^{hi}CD8 α ^{lo+} Zellen wiesen eine signifikant erhöhte CD8 α -Expression in den Fraktionen auf, die sich 2-, 3- oder 4-mal geteilt hatten (Abb. 24a). Die TCR1-Expression war nur nach 4, 5 und 6 Mitosen schwach aber signifikant höher als in der ungeteilten Zellpopulation. Die TCR1⁺CD8 α ^{hi+} Zellen zeigten hingegen in allen Tochtergenerationen eine signifikante Erhöhung der TCR1-Expression verglichen mit den Zellen, die nicht in Teilung gingen (Abb. 24b). Die CD8 α -Expression erhöhte sich stattdessen nur tendenziell während der Expansion. Die TCR1^{hi}CD8 α ^{hi+} Population wies eine geringere Dynamik auf. Lediglich die TCR1-Expression war in der zweiten, dritten und vierten Tochtergeneration signifikant höher als in der ungeteilten Fraktion.

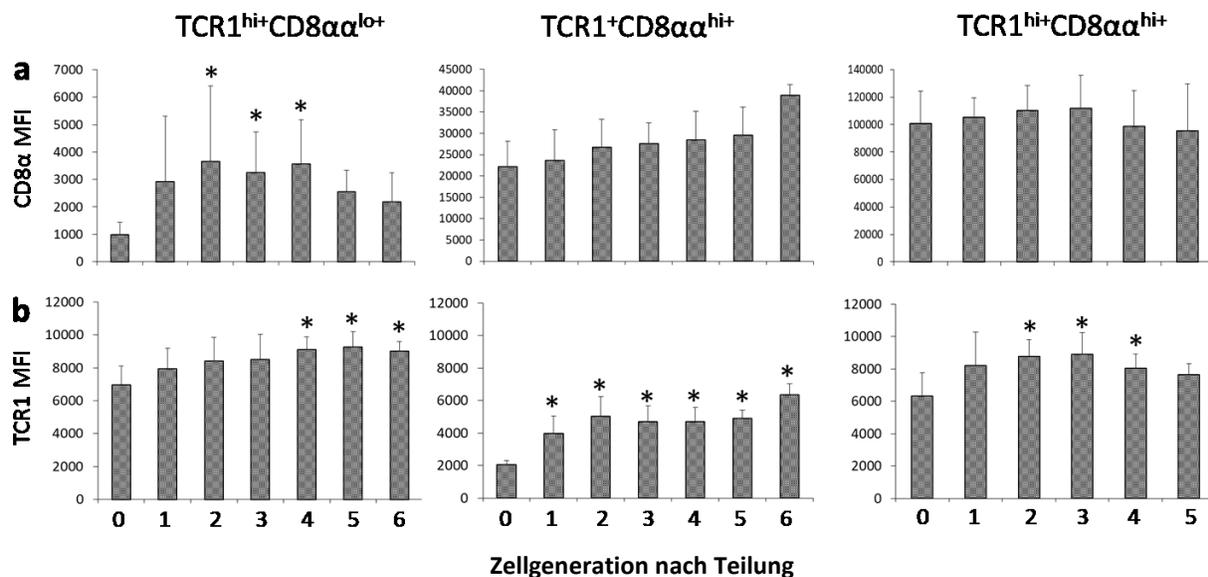


Abb. 24: Expressionsintensitäten (MFI) von CD8 α (a) und TCR1 (b) auf TCR1^{hi}CD8 α ^{lo+}, TCR1⁺CD8 α ^{hi+} und TCR1^{hi}CD8 α ^{hi+} Zellen in jeder durch Teilung entstandenen Zellgeneration (1-6) und der ungeteilten Fraktion (0) in Salmonella stimulierten Kulturen. Signifikante Unterschiede (* = p ≤ 0.05) der neu entstandenen Generation zur ungeteilten Fraktion wurden mittels studentischem t-Test berechnet.

3.3.3 Migrationsfähigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen

Die Fähigkeit auf chemotaktische Reize hin zu reagieren und zu migrieren wurde mit Hilfe eines Chemotaxis Transwell Assays untersucht. Dazu wurden zuerst primäre Monozyten-gereifte Makrophagen mit Salmonellen infiziert und über 48 h inkubiert. In dieser Zeit sollten die Makrophagen eine Reihe von

3. Ergebnisse

chemoattraktiv wirkenden Stoffen in das Medium abgegeben werden. Dieses konditionierte Medium wurde nicht selbst hergestellt, sondern von Frau Dr. Maria Braukmann aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die mittels MACS Säulen isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden in die Zellkultureinsätze eingesät und die Anzahl der durch die PET Membran migrierten Zellen nach 4 h mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen.

Die Resultate wiesen keine großen Unterschiede dahingehend auf, ob die $\gamma\delta$ -T-Zellen vorher ebenfalls mit Salmonellen stimuliert wurden oder nicht. Des Weiteren gab es auch keine signifikanten Unterschiede zwischen frischem Medium und konditioniertem Medium, wobei die $\gamma\delta$ -T-Zellen tendenziell eher zu konditioniertem Medium gewandert sind. Die Migration der Zellen erscheint daher eher ungerichtet und nicht Stimulus-gerichtet. Viel wichtiger ist jedoch erneut der Unterschied zwischen den $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen. Alle $CD8\alpha^{hi+}$ Populationen zeigten einen signifikant höheren Anteil migrierter Zellen als die $CD8\alpha^{-}$ und die $CD8\alpha^{lo+}$ Population. Dies ist umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, dass die $CD8\alpha^{-}$ $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation den mit Abstand größten Anteil der eingesäten Zellen ausmachte. Leider waren die Schwankungen zwischen den einzelnen Proben sehr groß, sodass kaum statistische Signifikanz erreicht wurde. Dennoch ist ein deutlicher Trend zu beobachten.

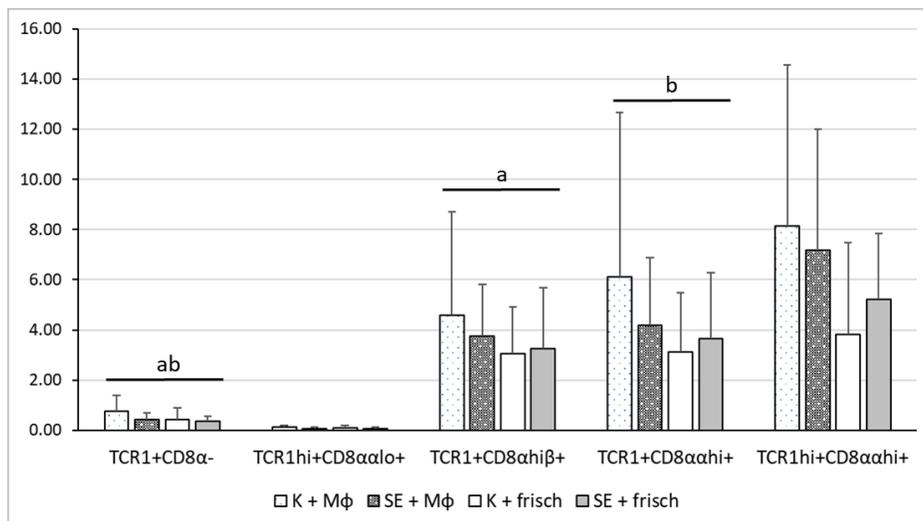


Abb. 25: Anteile der migrierten Zellen für jede $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation und Kombination aus Stimulation und Targetmedium. N = 18. Aufgetragen sind Mittelwerte und korrespondierende Standardabweichungen. Signifikanzen ($p \leq 0,05$): a) TCR1+CD8 α^{-} vs. TCR1+CD8 $\alpha^{hi\beta+}$; b) TCR1+CD8 α^{-} vs. TCR1+CD8 α^{hi+} .

3. Ergebnisse

3.3.4 mRNA-Expressionslevel ausgewählter Zytokine in $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen

Die funktionelle Klassifizierung wird nicht nur über spezifische Antigenexpression als viel mehr über eine einzigartige Zytokinsekretion vorgenommen. Um diese zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression verschiedener ausgewählter Zytokine mittels quantitativer real time RT-PCR analysiert. Um diese Untersuchungen für jede der fünf $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen durchzuführen, wurden diese aus IL-2 + *Salmonella*-stimulierten PBL Kulturen nach 24, 72 und 120 h mit Hilfe eines FACS-Sorters separiert. PBL, die nur unter IL-2 Zugabe kultiviert wurden, dienten als Vergleichskontrolle. Alle qRT-PCR Daten wurden des Weiteren zur internen Kontrolle des „House keeping“ Gens GAPDH normalisiert. TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} Zellen konnten aufgrund der sehr geringen Zellzahlen nur am Tag 5 hinsichtlich ihrer RNA-Expression untersucht werden. Die Zellzahlen der TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} waren nach 24 h ebenfalls zu gering, aufgrund dessen für diesen Zeitpunkt keine mRNA Daten erhoben werden konnten.

Das primäre pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ wurde vorrangig in TCR1⁺CD8 α ^{hi+} und TCR1⁺CD8 α ^{hi β} Zellen nach 24 h und 120 h gefunden (Abb. 26). Dabei entwickelten die TCR1⁺CD8 α ^{hi+} Zellen den höchsten Anstieg der Zytokin-mRNA von etwa 1500-fach verglichen mit der Kontrolle. Zudem wiesen sie signifikant höhere Transkriptionslevel als TCR1⁺CD8 α ⁻ und TCR1⁺CD8 α ^{hi β} Zellen nach 24 h Stimulation auf (Tab. 8). Die TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Population zeigte außerdem nach 72 h ein signifikant höheres IFN- γ mRNA Transkriptionslevel als ihre Schwesterpopulation, die TCR1⁺CD8 α ^{hi+}.

Das Transkriptionslevel von *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) war im Gegensatz zu IFN- γ nur bei TCR1⁺CD8 α ⁻ (nach 72 h und 120 h) und TCR1⁺CD8 α ^{hi β} (nach 72 h) signifikant zur Kontrolle erhöht (Abb. 26). Lässt man jedoch die *Salmonella*-spezifische Produktion außer Acht, so weisen im Allgemeinen die TCR1⁺CD8 α ^{hi β} Zellen nach 1 und 3 Tagen tendenziell die höchsten Werte auf.

Die Expression von Interleukin-17 (IL-17) war nach 24 h SE-Stimulation in allen drei zu diesem Zeitpunkt untersuchten $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen signifikant zur Kontrolle erhöht (Abb. 26; Tab. 8). Die TCR1⁺CD8 α ⁻ Population zeigte jedoch nach 3 und 5 Tagen Stimulation niedrigere IL-17 Level als die CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen (Abb. 26). Die neu definierten und erst während der Kultur aufkommenden Populationen der TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} und TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Zellen zeigten nach 3 und 5 Tagen Kultur ähnlich hohe IL-17-Transkriptionslevel wie die TCR1⁺CD8 α ^{hi+} und TCR1⁺CD8 α ^{hi β} Zellen an Tag 1, was auf eine verzögerte, aber gleiche Zytokinantwort dieser Zellen hindeutet.

Ähnlich zu IL-17 war das mRNA Transkriptionslevel von IL-22 nach 24 h SE-stimulierter Kultur auch bei allen drei zu diesem Zeitpunkt untersuchten $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen signifikant zur Kontrolle erhöht (Abb. 26;

3. Ergebnisse

Tab. 8). Des Weiteren zeigte die TCR1⁺CD8α⁻ T-Zellsubpopulation eine einzigartige, sehr starke und signifikant erhöhte IL-22 Expression nach 3 und 5 Tagen Kultur im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 8).

Das IL-21 mRNA Transkriptionslevel war hingegen nur sehr schwach erhöht. Eine signifikant zur Kontrolle erhöhte Expression konnte nur in TCR1⁺CD8α^{hi+} Zellen nach 3 und 5 Tagen und in TCR1⁺CD8α^{hiβ+} Zellen nach 5 Tagen Kultur detektiert werden (Abb. 26). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den γδ-T-Zellsubpopulationen.

Das wachstumsfördernde Zytokin IL-2 war auch nur sehr schwach in allen γδ-T-Zellsubpopulationen auffindbar. Überraschenderweise wies die TCR1^{hi+}CD8α^{lo+} Population nach 5 Tagen SE-stimulierter Kultur eine etwa 200-fache Erhöhung der mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle auf und war damit einzigartig (Tab. 8; Abb. 26). Leider ist dieses Ergebnis statistisch nicht belegbar, da aufgrund der niedrigen Zellzahlen nur eine sehr geringe Probenanzahl verfügbar war.

Tab. 8: Fold Changes der mRNA Transcriptionslevel im Verhältnis zur IL-2 Kontrolle nach 1, 3 und 5 Tagen nach Stimulation (dpS = days post Stimulation). Daten für die TCR1^{hi+}CD8α^{lo+} und TCR1^{hi+}CD8α^{hi+} Population fehlen, da nach 1 bzw. 1 und 3 Tagen zu geringe Zellzahlen aus den PBL Kulturen gewonnen werden konnten. vorhanden waren.

Zytokin	dpS	TCR1 ⁺ CD8α ⁻	TCR1 ⁺ CD8α ^{hi+}	TCR1 ⁺ CD8α ^{hiβ+}	TCR1 ^{hi+} CD8α ^{lo+}	TCR1 ^{hi+} CD8α ^{hi+}
INF-γ	1	4,41	1542,37	369,01	n.d.	n.d.
	3	2,98	4,20	2,15	n.d.	6,85
	5	4,38	45,33	5,15	89,57	18,22
TNF-α	1	2,62	0,73	0,86	n.d.	n.d.
	3	2,25	2,57	2,73	n.d.	3,75
	5	2,59	8,35	2,51	4,29	3,68
IL-17	1	2.794,42	4.182,07	199,47	n.d.	n.d.
	3	3,75	3,10	2,18	n.d.	7,03
	5	45,3	24,55	5,79	8,40	12,86
IL-22	1	48.476,57	13.003,99	21.382,85	n.d.	n.d.
	3	91,79	37,36	13,36	n.d.	18,00
	5	580,84	91,24	242,75	7,39	127,12
IL-21	1	1,60	9,87	1,99	n.d.	n.d.
	3	0,8	10,60	1,17	n.d.	23,97
	5	0,90	14,56	7,28	1,92	0,12
IL-2	1	0,98	1,02	0,05	n.d.	n.d.
	3	0,11	0,59	0,01	n.d.	0,39
	5	0,49	0,14	0,06	162,02	0,01

3. Ergebnisse

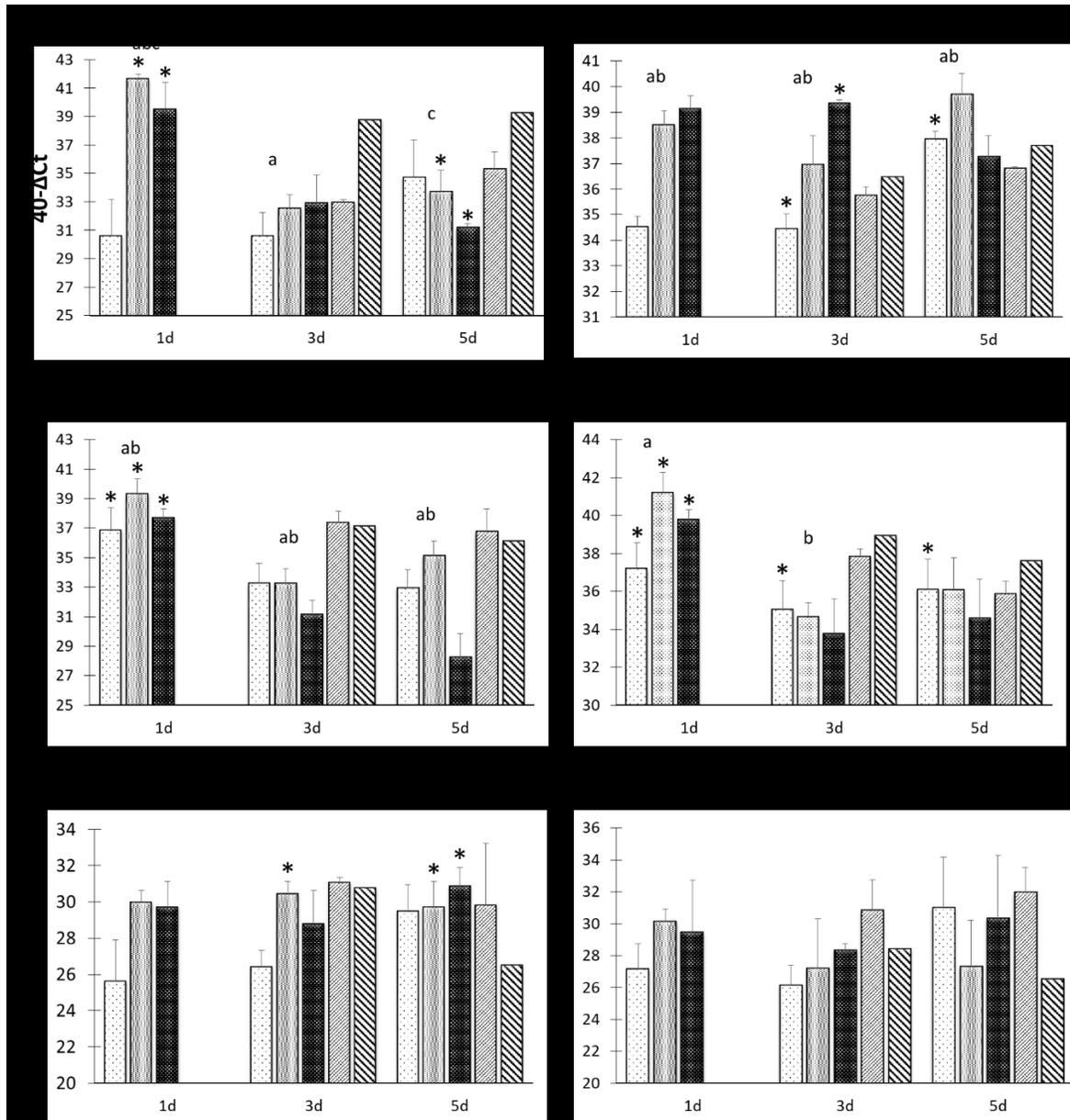


Abb. 26: mRNA Transcriptionslevel ausgewählter Zytokine in den jeweiligen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach 1, 3 und 5 Tagen SE-stimulierter Kultur. Gezeigt sind die $40-\Delta Ct$ Werte, die zum House keeping Gen GAPDH normalisiert wurden. Die Daten von Tag 1 für die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ und $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ Zellen fehlen, da nicht genügend Zellen zur Analyse aus den PBL Kulturen gewonnen werden konnten.

□ $TCR1^+CD8\alpha^-$; ▤ $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$; ■ $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta+}$; ▨ $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$; ▩ $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$.
 Signifikanzen: a: $TCR1^+CD8\alpha^-$ vs $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$; b: $TCR1^+CD8\alpha^{hi+}$ vs $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta+}$; c: $TCR1^+CD8\alpha^-$ vs $TCR1^+CD8\alpha^{hi\beta+}$; *: IL-2 + SE vs IL-2.

Die mRNA Transkriptionslevel der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 waren in allen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen zu allen Zeitpunkten und Versuchsbedingungen fast nicht detektierbar. Die getesteten Zytokinrezeptoren IL-7R, IL-25R und IL-21R sowie die Toll-like Rezeptoren (TLR) TLR2, TLR3 und

3. Ergebnisse

TLR4 zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten weder eine Erhöhung nach SE-Stimulation, noch gab es Unterschiede zwischen den $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen. Die Daten sind daher nicht gezeigt. Anhand der detektierten und höher exprimierten Zytokine kann geschlossen werden, dass aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen im Allgemeinen zumindest nach *Salmonella* Stimulation einen T-Helfer Typ 1 Phänotyp besitzen.

4. Diskussion

Untersuchungen zu den aviären $\gamma\delta$ T-Zellen könnten Hinweise auf ursprüngliche und evolutionär konservierte Funktionen und somit auf die grundlegende Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zellen in den Wirbeltieren liefern (Guzman und Montoya, 2018).

4.1 Etablierung einer Kultivierungsmethode für aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen

Bisher gab es kein geeignetes Zellkultursystem für primäre aviäre Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen im Speziellen. Da eine Kultivierung und Vermehrung der Zellen für weitere funktionelle Studien nötig war, wurde im ersten Teil der Arbeit nach geeigneten Stimulanzen und Zellkulturzusätzen gesucht um die Erhaltung, aber auch die Aktivierung und Induktion der Proliferation der Zellen zu gewährleisten. Aus Studien mit Lymphozyten von Mensch, Maus, Rind und Schwein waren zum Teil sehr widersprüchliche Herangehensweisen beschrieben.

Für die Entwicklung eines geeigneten Zellkultursystems wurden die Lymphozyten aus dem Blut isoliert und in Zellkulturmedium mit verschiedenen Zusätzen in Kultur gebracht. In regelmäßigen Abständen wurden die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 und die Proliferation der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Die Zugabe der unspezifisch wirkenden Stimulanzen Phorbol-myristat-acetat (PMA), Phytohaemagglutinin (PHA) und Concanavalin A (ConA) führte zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der Zellen. Die weit verbreitete Benutzung von ConA zur Aktivierung der T-Zell-Proliferation sowie PHA zur Aktivierung und Reifung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht als für aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen optimale Strategie bestätigt werden. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit PMA zu einer raschen (innerhalb von 4 Stunden) und starken Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen, die durch eine erhöhte CD25-Expression in allen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen messbar war. Zudem war eine leichte Induktion der Zellteilung erkennbar. PMA imitiert durch seine strukturelle Ähnlichkeit das Diacylglycerol (DAG) und aktiviert damit die Protein Kinase C (PKC). Gewöhnlich wird Ionomycin zugesetzt um einen intrazellulären Ca^{2+} -Influx zu induzieren, der für die vollständige PKC Aktivierung notwendig ist. Die nachgeschalteten Signalwege führen zu verschiedenen Antworten der Zellen, einschließlich Proliferation (Szamel und Resch, 1995). Interessanterweise fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Benutzung von PMA allein oder in Kombination mit Ionomycin. Diese Ergebnisse weisen auf ein Vorhandensein der speziellen Protein

4. Diskussion

Kinase C Isoenzym Typ θ (PKC θ) hin, deren Aktivierung und Signaltransduktion Calcium-unabhängig passiert. Diese PKC θ wurde bereits auf bestimmten T-Zellen der Maus und des Menschen nachgewiesen (Meller et al., 1999; Isakov und Altman, 2012). Zudem reguliert sie Transkriptionsfaktoren, die für eine optimale IL-2 Antwort in diesen Spezies verantwortlich sind (Isakov and Altman, 2002), was die Erhöhung der CD25-Expression auf der Zelle erklären könnte.

Eine Verwendung der Interleukine IL-2, IL-12 und IL-15 führte ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während IL-12 und IL-15 in diversen Konzentrationen keine messbare Wirkung auf die Proliferation der Zellen hatten, kam es nach Zugabe von IL-2 zu einer erheblichen Zellteilung. Überraschenderweise zeigten sowohl CD25⁻ als auch CD25⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen eine deutliche Proliferation. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Vorhandensein der α -Kette des IL-2 Rezeptors, der die Affinität zum Liganden um das 1000-fache erhöht, nicht zwingend notwendig ist um IL-2 zu binden und nachgeschaltete Signalwege ausreichend zu aktivieren. Zudem war eine Erniedrigung der CD25 Expression auf den $\gamma\delta$ -T-Zellen durch IL-2 Stimulation zu finden. Für humane T-Zellen wurde bereits gezeigt, dass eine IL-2 Stimulation die Expression des eigenen Rezeptors erhöht und eine starke Expansion der Zellen induziert (Teng et al., 2006). Im Gegensatz dazu ist ebenfalls ein negativer „Feedback Loop“ bekannt, in dem IL-2 dessen eigenen Rezeptor herunter reguliert und in Folge dessen die eigene Transkription hemmt (Lan et al., 2008).

Da PMA eine starke Erhöhung der CD25-Expression auf der Oberfläche der $\gamma\delta$ -T-Zellen induzierte, lag eine kombinatorische Stimulation mit dem korrespondierenden Zytokin IL-2 nahe. Wie zu erwarten war, vermittelten IL-2 und PMA in Kombination einen synergistischen Effekt auf die CD25-Expression und Proliferation der Zellen. Zudem wurden alle $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen angesprochen. Eine Kombination aus IL-2 und PMA wurde bislang kaum in Zellkulturversuchen angewandt. Dennoch ist ein ähnlicher synergistischer Effekt auf die Proliferationsrate bereits für humane und porcine T-Zellen beschrieben (Cheon et al., 2014). Trotz dessen sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher ungeklärt. Zudem bleibt offen, ob die Stimulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen direkt erfolgte oder indirekt durch Signale anderer Zellen in der Kultur, da diese Versuche bislang nicht mit separierten $\gamma\delta$ -T-Zellen wiederholt wurden.

Als Standardsystem für die weitere funktionelle Charakterisierung der Zellen und Stimulation mit *Salmonellen* wurde die Zugabe von IL-2 als Zellkulturzusatz festgelegt, da es einen positiven Effekt auf alle $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen ausübte. Zum anderen ist bekannt, dass eine vollständige T-Zellaktivierung nur mit Hilfe eines dritten Signals in Form eines pro-inflammatorischen Zytokins erfolgt (Curtsinger et al., 2010). Durch das Zytokin allein konnte das Überleben der Zellen in Kultur bereits maßgeblich verbessert werden. Zudem wurde die vermutete stress-vermittelte Aktivierung der Zellen reduziert und eine Proliferation aller Subpopulationen induziert. Selbst separierte $\gamma\delta$ -T-Zellen konnten durch IL-2 mehrere Wochen in Kultur am Leben erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.2 Neue $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen mit erhöhter $\gamma\delta$ -TCR-Expression

Die durchflusszytometrische Untersuchungen sowohl des Blutes der immunisierten Jungtiere als auch der IL-2 stimulierten PBL Kulturen brachte TCR1 stark positive (TCR1^{hi+}) Zellen zum Vorschein. Eine Erhöhung der Expression des T-Zellrezeptors wurde bislang im Huhn noch nicht beschrieben. Die CD8 α ^{hi+} Population weist normalerweise verglichen mit der CD8 α ^{lo+} Population eine leicht schwächere Expression des $\gamma\delta$ -TCR auf. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach beschrieben, obwohl weitere Studien dazu fehlen (Tauchi et al., 1992, Meissner et al., 2003). Nach der Immunisierung der Jungtiere mit Salmonella-Vac (SEvac) kam es hingegen zu einer deutlichen Erhöhung der $\gamma\delta$ -TCR-Expression bei einer gleichzeitigen Erhöhung der CD8 α -Expression auf CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diese führte zur Aufspaltung der Population in eine TCR1⁺CD8 α ^{hi+} und eine TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Population, die nach Stimulation der Zellen mit IL-2 mit oder ohne SEvac noch deutlicher ausfiel. Des Weiteren entwickelte sich nach Kultivierung der Zellen eine weitere Population, die ebenfalls stark positiv für den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor war, hingegen aber nur eine schwache CD8 α -Expression aufwies (TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+}). Bisher gab es lediglich eine Beschreibung von TCR1^{hi+} Zellen beim Schwein, die in frisch isolierten Zellen aus dem peripheren Blut gefunden wurden (Stepanova und Sinkora, 2013). Die dort gefundenen TCR1 stark positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen verloren jedoch durch Kultivierung diese starke Expression. Funktionelle Daten dieser Zellen fehlen. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen aus den vorliegenden Studien zeigten hingegen eine Zunahme der TCR1-Expression durch IL-2 Stimulation im Verlauf der Kultivierung. Eine ähnliche Erhöhung der TCR1-Expression wurde bisher nur bei $\gamma\delta$ -T-Zellen aus dem Thymus gezeigt, aber auch nur, wenn sie über mehrere Tage unter IL-2-Stimulation kultiviert wurden (Stepanova und Sinkora, 2013). Die Autoren vermuten einen leicht differenzierteren Phänotyp dieser Zellen. $\gamma\delta$ -T-Zellen aus unseren Experimenten zeigten hingegen einen sehr raschen Anstieg der TCR1-Expression und eine dementsprechend frühe Aufteilung in die weiteren Subpopulationen. IL-2 ist ein sehr wichtiges Zytokin, welches die T-Zell-Aktivierung, die Expansion und die Differenzierung in Effektor- bis hin zu Gedächtniszellen steuert (Boyman et al., 2010, Liao et al., 2011; Boyman und Sprent, 2012). Das Vorhandensein von TCR1 stark positiven Zellen nach IL-2 Zugabe und Kultivierung der Lymphozyten von unbehandelten Kontrolltieren weist darauf hin, dass das Zytokin allein die Zellen bereits aktiviert und einen Differenzierungsprozess einleitet. Es bleibt zu klären, welche Zytokine *in-vivo* nach Immunisierung für die Differenzierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen verantwortlich sind, aber in den Lymphozyten-Kulturen ist IL-2 vermutlich der Faktor, der diese Prozesse maßgeblich steuert.

Leider gibt es bisher keine weiterführenden funktionellen Untersuchungen von TCR1^{hi+} Zellen. Der T-Zellrezeptor selbst schaltet durch angeschlossene Phosphotyrosinkinasen eine Vielzahl an Kinasesignalwegen der Zelle, darunter MAPK und PI3K an, die letztlich zur Aktivierung der

4. Diskussion

Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, AP-1 und NFAT führen, die ihrerseits eine Vielzahl von Genen regulieren (Cantrell, 2002; Huang und Wange, 2004). Um festzustellen, welche Signale genau durch eine erhöhte Expression des T-Zell-Rezeptors verstärkt werden, könnten gesamt-mRNA-Sequenzierungen der verschiedenen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen an verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Interessanterweise weisen beide neu definierten aviären TCR1^{hi+} Subpopulationen zusätzlich den CD8 $\alpha\alpha$ homodimeren Co-Rezeptor auf der Zelloberfläche auf. Im Gegensatz zur CD8 $\alpha\beta$ Form wird angenommen, dass es sich bei der CD8 $\alpha\alpha$ Form des Rezeptors eher um einen Co-Repressor handelt, der auf aktivierten CD8⁺ Zellen die Schwelle zur T-Zell-Aktivierung erhöht und dabei die Überaktivierung der Zellen oder exzessive zytolytische Aktivität verhindert (Madakamutil et al., 2004; McNicol et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte TCR1-Expression ist, dass dadurch der inhibitorische Effekt des CD8 $\alpha\alpha$ Co-Rezeptors umgekehrt wird und die Zelle trotzdem wieder stärker aktiviert werden kann.

Meine Hypothese ist daher, dass es sich bei diesen Zellen um reifere, weiter differenzierte $\gamma\delta$ -T-Zellen handelt, die vor allem während einer Salmonella-Infektion eine wichtige Rolle spielen. Diese Hypothese wird im Abschnitt „Hypothetische Differenzierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen“ genauer erläutert.

4.3 Dynamik in der CD25-Expression

Im Zuge des Immunisierungsversuchs von Eintagsküken wurden sowohl die absoluten Zahlen der CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation als auch die CD25-Expressionsintensität über den MFI (*median fluorescence intensity*) bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Anstieg der Zahlen CD25⁺ Zellen in der CD8 $\alpha\alpha$ ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation im Blut von immunisierten Küken gefunden. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Erkenntnissen der Arbeitsgruppe, die ebenfalls einen höheren Anteil CD25⁺CD8 $\alpha\alpha$ ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Salmonella-Stimulation von Vollblutproben beschrieben (Braukmann et al. 2015). Ergänzend dazu ist bereits seit längerem eine erhöhte Expression der IL2-R α -Kette auf $\gamma\delta$ -T-Zellen des Huhns (Pieper et al., 2011) und des Rindes (Hedges et al., 2007) nach Salmonella Typhimurium Infektion bekannt. Diese Hochregulierung spricht für eine Aktivierung der T-Zellen, die gleichzeitig die Affinität zum Wachstumsfaktor IL-2 erhöht. Eine Korrelation zwischen Aktivierungsstatus und Proliferation konnte in der vorliegenden Arbeit sehr schön nachgewiesen werden und ist im „Abschnitt Etablierung einer Kultivierungsmethode für aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen“ diskutiert.

In den weiteren funktionellen Studien der vorliegenden Arbeit wurde sich mit der Dynamik der CD25-Expression auseinandergesetzt. Der große Vorteil des verwendeten Proliferationsfarbstoffes ist, dass nicht alle Zellen gleichzeitig mit der Zellteilung beginnen bzw. sich gleich oft teilen. So hat man nach 72 oder 96

4. Diskussion

In Kultur eine repräsentative Mischung aus sich 6-mal geteilten Zellen, erst einmal geteilten Zellen und sich nicht teilender Zellen. Anhand dieser Verteilung kann man gut die Expression eines Antigens im Verlauf der T-Zellexpansion verfolgen. Eine hohe Expression von CD25 in Antwort auf Salmonella Stimulation wurde immer in CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen gefunden. Die CD25-Expression zeigte jeweils einen Anstieg in den ersten drei bis vier Zellteilung, wobei nur CD25^{hi+} Zellen überhaupt in Zellteilung gingen. Dieses Phänomen war vor allem in der TCR1⁺CD8 α ^{hi+} und TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} Population zu beobachten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-2 und sein korrespondierender „high affinity“ Rezeptor für die Induktion der Proliferation notwendig ist und ebenfalls das Überleben der Zellen sichert. Eine dynamische CD25-Expression während Immunreaktionen ist bereits hinreichend bekannt (Schluns and Lefrancios, 2003) und könnte auch Anzeichen für verschiedene Differenzierungsstadien einer T-Zelle sein. Kalia und Kollegen (2010) berichteten ähnlich zur vorliegenden Arbeit einen Rückgang der CD25-Expression auf murinen T-Zellen 3,5 Tage nach der Infektion. Im weiteren Verlauf bleiben die Zellen aber aktiviert, was durch eine gleich bleibende höhere Expression von CD44 im Vergleich zu naiven Zellen gekennzeichnet ist. Diese Erkenntnisse werden von Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gestützt. Wir fanden ebenso eine höhere CD44-Expression in proliferierenden „Responder“ T-Zellen im Vergleich zu „Non-Responders“, die sich nicht teilten. Andere Studien fanden auch eine erhöhte CD25- und CD44-Expression auf proliferierenden T-Zellen im Gegensatz zu nicht-proliferierenden (Waters et al., 2003). Wir vermuten eine Aktivierung der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Salmonellen, die durch eine erhöhte CD25- und CD44-Expression messbar ist, gefolgt von einer extensiven Proliferation. Später wird die IL-2 vermittelte Expansion durch eine Herunterregulation der IL2-R α -Kette kontrolliert um eine Überstimulation und den Aktivierungs-induzierten Zelltod zu vermeiden. Es wird angenommen, dass die CD25^{lo+} Zellfraktion den Ursprung einer langlebigen Gedächtnispopulation bilden, während die CD25^{hi+} Zellen einen Effektorphänotyp besitzen und mehr terminal differenziert erscheinen (Belz und Masson, 2010; Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010). Weitere Ausführung dazu sind im Abschnitt 4.1 Gedächtnisleistung diskutiert.

4.4 Mögliche Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die umfassende funktionelle Charakterisierung der $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen. Dazu wurden weitere phänotypische Merkmale mit Hilfe umfangreicher durchflusszytometrischer Messungen analysiert. Zudem wurden die mRNA-Transkriptionslevel verschiedener Zytokine mittels von qRT-PCR untersucht.

4. Diskussion

4.4.1 Gedächtnisleistung

Um eine mögliche Gedächtnisfunktion von einzelnen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen zu erforschen, wurden Hühnerküken am 2. Lebenstag mit einem herkömmlichen *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Lebendimpfstamm (SEvac) immunisiert und nach Standardprotokoll booster-immunisiert. Es folgten durchflusszytometrische Analysen der peripheren T-Zellpopulationen und eine *in-vitro* Re-Stimulation der isolierten primären Lymphozyten um eine Gedächtnisleistung zu provozieren. Des Weiteren wurden mögliche Unterschiede zwischen den Selektionslinien und den phylogenetisch divergenten Linien betrachtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Erhöhung der CD8 α -, aber auch der TCR1-Expression auf CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen immunisierter Tiere ab dem 8. Lebenstag. Diese Erhöhung war am deutlichsten bei $\gamma\delta$ -T-Zellen von weißen Legehennen ausgeprägt. Die CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation gilt seit längerem als besonders wichtige Zellpopulation während einer Salmonella-Infektion. Es wurde schon mehrfach eine Erhöhung dieser Zellen im Blut und Geweben nach einer Salmonella-Infektion beobachtet (Berndt et al., 2006; Pieper et al., 2011; Penha Filho et al., 2012). Gleichzeitig konnte bereits eine Erhöhung der CD8 α -Expression auf diesen Zellen nachgewiesen werden (Berndt et al., 2006; Pieper et al., 2011.) Diese Beobachtungen konnten im Zuge der durchgeführten Studien nach Immunisierung der Küken bestätigt werden. Studien mit Ratten zeigten ähnlicher Weise eine Herunterregulierung der CD8 β -, aber nicht der CD8 α -Expression nach *in-vitro* Stimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen (Straube und Herrmann, 2001). Es ist unlängst bekannt, dass der CD8 $\alpha\alpha$ homodimere Co-Rezeptor in der Maus und beim Mensch das Überleben der Zellen fördert und eine Differenzierung zu Gedächtniszellen begünstigt (Madakamutil et al., 2004, Walker et al., 2013). Während die CD8 $\alpha\beta$ heterodimere Form des Co-Rezeptors die Signale des T-Zell-Rezeptors ins Zellinnere weiterleitet und verstärkt, scheint die CD8 $\alpha\alpha$ homodimere Form eher als ein Co-Repressor zu wirken. So wird der durch Aktivierung induzierte Zelltod vermieden und die Zellen können sich weiter zu Gedächtniszellen differenzieren (Eberl et al., 2002).

Für eine Differenzierung zu Gedächtniszellen spricht ebenfalls die gefundene Erniedrigung der CD25-Expression auf CD25⁺CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen aus dem Blut nach Immunisierung der Tiere. Während einer Immunreaktion kommt es normalerweise zur Aktivierung der T-Zellen, die nach einigen Tagen zurückgeht um eine Überaktivierung der Immunzellen zu vermeiden (Schluns und Lefrancois, 2003). Es ist möglich, dass die gewählten Messzeitpunkte vom Tag 7 an bereits in der Phase des Rückgangs der Immunantwort lagen. Es ist jedoch aus weiteren Studien bekannt, dass die CD25-Expression auf peripheren $\gamma\delta$ -T-Zellen des Huhns einer starken Dynamik unterliegt und diese auch nach *in-vitro* Stimulation der Lymphozyten von gesunden Tieren wieder auf ein Normallevel zurückgeht (Braukmann et al., 2015). Aus anderen

4. Diskussion

Studien ist ebenfalls eine dynamische CD25-Expression im Zusammenhang mit der Gedächtnisformierung von T-Zellen bekannt (Kalia et al., 2010). Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass eine längere und ausgeprägte CD25-Expression auf kurzlebigen Effektorzellen zu finden ist, wohingegen eine kurze CD25-Expression gefolgt von einer Erniedrigung die Differenzierung zu Gedächtniszellen einleitet (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010; Boyman et al., 2012; Castro, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Existenz von TCR1-stark positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut des Huhns nachgewiesen. Aufgefallen ist diese Erhöhung zunächst nach Immunisierung der Tiere. Eine SEvac-Stimulation der isolierten Lymphozyten konnte hingegen auch diese Population hervorrufen, wobei sie bei immunisierten Tieren stets deutlicher auftrat. Im Zuge des Immunisierungsversuches mit dem Ziel, die Gedächtnisfunktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu evaluieren, sind TCR1^{hi+} Zellen als besondere Kandidaten aufgefallen. Sowohl die Population der TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+} als auch TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Zellen nehmen nur einen sehr geringen prozentualen Anteil von 0,2 bis 4 % der Gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen ein, was die Theorie einer Gedächtniszellpopulation weiter bestärkt, da diese in der Regel bei jungen Individuen nur sehr gering ausfällt. Des Weiteren zeigten allein diese beiden neu definierten Populationen der $\gamma\delta$ -T-Zellen adulter Hühner eine Gedächtnis-ähnliche Proliferation nach der *in-vitro* Re-Stimulation mit dem gleichen *Salmonella* Enteritidis Stamm. Die Zellen proliferierten früher und deutlich stärker nach Immunisierung und Re-Stimulation im Vergleich zu stimulierten Lymphozyten nicht immunisierter Tiere. Darüber hinaus war eine erhöhte IFN- γ mRNA Transkription von $\gamma\delta$ -T-Zellen der immunisierten WLA Hühner zu finden. Die gesteigerte Proliferation und die schneller auftretenden Effektoreigenschaften sind klassische Kennzeichen für Gedächtniszellen (Farber et al., 2014; Rosenblum et al., 2016; Mahnke et al., 2013). Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass aviäre Lymphozyten aus der Milz nach Immunisierung und darauffolgender Re-Stimulation mit ConA oder S. Enteritidis deutlich stärker proliferieren (Okamura et al., 2004). Dieses Phänomen scheint jedoch nur bei immunologisch reifen, erwachsenen Tieren aufzutreten, was bisherige Erkenntnisse bestätigt, dass nur eine wiederholte Immunisierung von Küken bzw. jungen Legehennen zu einem effektiven Schutz vor einer *Salmonella*-Infektion führt.

Neben Proliferationsdaten, lieferten die qRT-PCR Analysen interessante Erkenntnisse. Re-stimulierte gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen der immunisierten WLA Hühner zeigten eine gesteigerte IFN- γ Transkription verglichen mit stimulierten Zellen der nicht-immunisierten Gruppe. Aus voran gegangenen Studien der Arbeitsgruppe ist bereits bekannt, dass CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen die hauptsächlichen IFN- γ -Produzenten während einer *Salmonella*-Infektion des Huhns sind (Pieper et al., 2011). Die neu definierte Population der TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen geht höchst wahrscheinlich aus der Population der CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen hervor, was eine IFN- γ Sekretion dieser Zellen wahrscheinlich macht. Daher führte ein erhöhtes Auftreten dieser Zellen nach Re-Stimulation der Zellen immunisierter Tiere zu einer gesteigerten IFN- γ Produktion

4. Diskussion

im Vergleich zu stimulierten Zellen unbehandelter Tiere. Die Daten legen daher die Schlussfolgerung nahe, dass die gefundene Erhöhung des IFN- γ Transkriptionslevels der Gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Re-Stimulation auf diese Population zurückzuführen ist. Da diese vermutete Gedächtniszellpopulation der TCR1^{hi}CD8 α ^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Hühnern der Linie WLA am deutlichsten auftritt, ist auch nur bei dieser Linie der Unterschied in der IFN- γ Transkription signifikant erhöht. Zusätzlich zu unseren eigenen Beobachtungen wurde eine erhöhte IFN- γ , IL-17 und IL-22 Produktion nach einer *Salmonella enterica* Immunisierung beim Huhn bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen (Matulova et al., 2012), die nur durch spezifische Gedächtniszellen hervorgerufen worden sein kann. Die Fähigkeit zur Gedächtnisleistung von $\gamma\delta$ -T-Zellen wird auch beim Rind vermutet, da eine Immunisierung gegen BCG oder *Leptospira borgpetersenii* zu einer Erhöhung von WC1⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen und einer verstärkten IFN- γ -Sekretion führt (Blumerman et al., 2007; Naiman et al., 2001, 2002; Buza et al., 2009).

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind mittlerweile als Gedächtniszellen bei Mensch und Maus anerkannt und rückten in den letzten Jahren mehr in den Fokus der Forschung (zusammengefasst in Lalor und McLoughlin, 2016). Eine Gedächtnis-ähnliche Proliferation der Zellen nach Re-Stimulation wurde für $\gamma\delta$ -T-Zellen von Makaken nach BCG- oder Pockenimmunisierung nachgewiesen (Shen et al., 2002; Shao et al., 2009). Des Weiteren wurden Gedächtnis-ähnliche $\gamma\delta$ -T-Zellen mehrfach in der Haut der Maus beschrieben (Hartwig 2015; Ramirez-Valle et al., 2015). Es gibt Beweise, dass murine V γ 2V δ 9-T-Zellen einen Schutz gegen erneute *Listeria monocytogenes* oder *Staphylococcus aureus* Infektionen durch ein längeres Überleben der Zellen und stärkere IFN- γ und IL-17 Sekretion vermitteln (Sheridan et al., 2013; Murphy et al., 2014). Aufgrund der Erkenntnisse aus anderen Tierspezies liegt eine konservierte Gedächtnisfunktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen nahe. Wie im letzten Abschnitt beschrieben wurde, begründen eine Vielzahl anderer Publikationen das Vorhandensein einer Gedächtnisfunktion mit einer erhöhten Proliferation und schnellerer und stärkerer Ausschüttung von Effektorzytokinen nach Re-Stimulation. Aufgrund dessen postulieren wir die beiden neu beschriebenen TCR1^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen als Gedächtniszellen und belegen zumindest eine Mitwirkung dieser Zellen beim Impfschutz gegen enterale *Salmonella*- Infektionen beim Huhn.

4.4.2 Mögliche Antigenpräsentation

Die hier präsentierten Analysen der *S. Enteritidis* stimulierten aviären Lymphozytenkulturen zeigten zum ersten Mal eine Expression des *Major Histocompatibility Complex II* (MHC-II) Antigens auf der Oberfläche von bestimmten aviären $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen. MHC-II wird normalerweise nur auf professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APCs) wie z.B. Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und ist essentiell für die APC-T-Zell/B-Zell Interaktion. Es wurde jedoch auch schon auf nicht-

4. Diskussion

professionell Antigen präsentierenden Zellen wie z.B. Keratinozyten, Fibroblasten und Epithelzellen gefunden. Des Weiteren gibt es schon seit langem Beweise für MHC-II⁺ T-Zellen bei Pferd, Hund, Ratte und Rind (Isaacson et al., 1998; Bendali-Ahcene et al., 1997; Doveren et al., 1986; Reizis et al., 1994; Guzman et al., 2012). In diesen Studien wird MHC-II jedoch meist nur als weiterer Aktivierungsmarker angesehen. Für humane T-Zellen gab es hingegen schon früh Hinweise auf die Fähigkeit, absorbierte Antigene präsentieren zu können (Pichler et al., 1994, Barnaba et al., 1994). Mittlerweile ist für humane und murine T-Zellen bekannt, dass MHC-II⁺ T-Zellen typischerweise 3-5 Tage nach der T-Zellaktivierung auftreten und als professionelle Antigen präsentierende Zellen (APCs) agieren und dadurch die Proliferation und IL-2 Produktion von ruhenden T-Zellen aktivieren können (Taams et al., 1999; Holling et al., 2004). Andererseits können sich aber auch aktivierte MHC-II⁺ Zellen gegenseitig in ihrer Aktivität durch das Auslösen von Apoptose oder Anergie hemmen. Es wird angenommen, dass sie durch ihre unterschiedlichen Wirkmechanismen eine wichtige regulatorische Rolle während der Immunantwort übernehmen (Holling et al., 2004).

In unseren Studien mit aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen waren vor allem TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Zellen MHC-II⁺, wobei alle CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen unterschiedlich große Anteile an MHC-II⁺ Zellen entwickelten. Der Anteil der MHC-II⁺ Zellen stieg im Verlauf der fünftägigen Kultur und IL-2 + SE-Stimulation an und war am 5. Tag am höchsten. Im Gegensatz dazu bildeten sich in den nur mit IL-2 stimulierten Zellkulturen keine MHC-II⁺ Zellpopulationen. Dies deutet darauf hin, dass diese Expression durch den Kontakt mit den Salmonellen hervorgerufen wurde und diese $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Ob sie allerdings tatsächlich Antigene anderen Zellen präsentieren und diese damit aktivieren oder ob die Effekte inhibitorisch sind, bleibt in weiteren Experimenten zu klären.

Unter den $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden ebenfalls im Menschen (Himoudi et al., 2012), beim Rind (Toka et al., 2011, Collins et al., 1998) und dem Schwein (Gerner et al., 2004) Antigen präsentierende Populationen nachgewiesen. Porcine MHC-II⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren ebenfalls CD8 α , wohingegen CD8 α ⁻ Zellen kein MHC-II tragen (Gerner et al., 2004). Weitere funktionelle Untersuchungen sind bis dato nicht unternommen wurden.

Nichtsdestotrotz stimmen diese Ergebnisse mit den Daten der vorliegenden Arbeit überein, denn auch aviäre MHC-II⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen befinden sich unter den CD8 α ^{hi+} Subpopulationen. Funktionelle Studien im Schwein zeigten, dass diese MHC-II⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen Antigene über direkte T-T-Zellinteraktion CD4⁺ Zellen präsentieren können (Takamatsu et al., 2002, 2006). Erste funktionelle Untersuchungen von aviären MHC-II⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen im Rahmen dieser Arbeit ergaben widersprüchliche Ergebnisse und müssen in weiteren Studien fortgesetzt werden (nicht gezeigte Daten). Während naive CD4⁺ Zellen keine Reaktion zeigten, wiesen CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen eine leicht erhöhte Proliferation auf, wenn sie mit vorher aktivierten MHC-II⁺

4. Diskussion

CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen co-kultiviert wurden. Dies war jedoch nur bei Zellen mancher Tiere zu beobachten. Bei PBL Kulturen anderer Tiere kam es zu keiner Initiierung der Proliferation durch prä-aktivierte MHC-II⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen, im Gegenteil, zu einer Inhibierung der Proliferation. Wie bereits oben erwähnt können auch regulatorische Prozesse durch Antigen-präsentierende Zellen eingeleitet werden, um eine Überstimulation der Immunreaktion zu verhindern. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind für aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer Salmonella Infektion in zukünftigen Experimenten zu klären.

4.4.3 Funktionen der $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen aufgrund ihrer Zytokinproduktion

Eine Immunzellfunktion ist nicht nur bestimmt durch ihre Aktivierung und ausreichende Expansion, sondern viel mehr durch die Produktion eines ganz bestimmten Zytokinprofils. Für die Genexpressionsanalysen wurde die real-time RT-PCR genutzt, da diese aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Genauigkeit die heutzutage am häufigsten verwendete Methode darstellt, um die Genexpression, v.a. von gering exprimierten Transkripten wie beispielsweise Zytokin-mRNAs nachzuweisen und zu quantifizieren.

Genau wie $\alpha\beta$ -T-Zellen werden humane und murine $\gamma\delta$ -T-Zellen inzwischen in einen T-Helfer Typ 1 oder Typ 2 eingeteilt, je nachdem ob sie IL-2 und IFN- γ oder IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren (Vermijlen et al., 2007; Dodd et al., 2009; Dunne et al., 2010). Viele Studien vergangener Jahre haben die Zytokinproduktion von aviären gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen und anderer Immunzellen nach *in-vitro* und *in-vivo* *Salmonella* Exposition untersucht (Kaiser et al., 2000, 2006; Okamura et al., 2004). Jedoch hat sich bisher keine größere Studie auf die Erforschung von einzelnen $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen konzentriert. Arbeiten unserer Gruppe fokussierten bereits in der Vergangenheit auf die Zytokinsekretion von einzelnen Populationen. Es wurde bereits gezeigt, dass CD8 α^+ $\gamma\delta$ -T-Zellen während einer Salmonella Infektion einen T Helfer Typ 1 Phänotyp besitzen, der durch eine hohe IFN- γ Produktion gekennzeichnet ist (Pieper et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Zytokin-mRNA Expression von allen fünf definierten $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen betrachtet, die einen tieferen Einblick in deren funktionelle Heterogenität gestattet. Zum einen konnten bisherige Ergebnisse bestätigt werden, indem wieder eine starke IFN- γ mRNA-Expression in CD8 α^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen 24 h nach der SE-Stimulation detektiert wurde, die sich im späteren Verlauf fortsetzte. Darüber hinaus zeigten die im Verlauf der Kultur entstehenden TCR1^{hi}CD8 $\alpha^{lo+/hi}$ Populationen ebenfalls eine deutliche Erhöhung der IFN- γ mRNA-Expression.

Diese Daten wurden erweitert durch erste Erkenntnisse zu einer erhöhten IL-17 mRNA Transkription in Antwort auf eine SE-Stimulation, die nach 24 h in allen $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen auftrat. Während das Expressionslevel in der darauffolgenden Kulturzeit in den meisten Subpopulationen wieder abfiel, wiesen

4. Diskussion

die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ und $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ Zellen weiterhin hohe Expressionslevel auf, wenngleich die Unterschiede zur IL-2 Kontrolle nicht mehr signifikant waren. Die Existenz von IL-17 exprimierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn wurde bereits beschrieben (Walliser und Göbel, 2018). Diesen Zellen wurden bislang für Mensch und Maus schon mehrfach bewiesen und gelten weithin als „angeborene“ Quelle für IL-17 (Roark et al., 2008; Shibata et al., 2007; 2008). Sie können direkt die Mobilisierung und Aktivierung von Neutrophilen induzieren und treiben die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen voran (Sutton et al., 2009; Caccamo et al., 2011). Tatsächlich sind IL-17⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einer Reihe Autoimmunkrankheiten assoziiert (Kikly et al., 2006; Patil et al., 2015). Eine Sekretion von IL-17 geht meistens mit der Produktion von IL-21 und IL-22 einher und erfolgt bei Vorhandensein von IL-1 β und IL-23 ohne dass eine Aktivierung des T-Zellrezeptors nötig ist (Sutton et al., 2012). IL-17 und IL-22 üben beide einen massiven Einfluss auf Epithelzellen aus und agieren dabei als wichtige Regulatoren der Gewebshomöostase und der Barrierefunktion des Epithels. Während IL-17 eher als Treiber von inflammatorischen Prozessen fungiert, übernimmt IL-22 mehr den regulatorischen Part und ist an der Geweberegeneration beteiligt.

Das IL-22 mRNA Expressionslevel war in der vorliegenden Studie ähnlich zu IL-17 nach 24 h in allen $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen hochgradig erhöht. Dennoch war die stärkste Erhöhung der IL-22 mRNA Transkription in der $TCR1^{+}CD8\alpha^{-}$ Subpopulation messbar. Es wird angenommen, dass eine Co-Sekretion von beiden Zytokinen mit einem frühen Differenzierungsstatus assoziiert ist (Eyrich et al., 2010). Dies könnte die gleichermaßen recht hohe Expression beider Zytokine in allen drei $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen nach 24 h SE-Stimulation erklären. Im weiteren Verlauf kommt es hingegen zu einer spezifischeren Reaktion der Zellen und nur $TCR1^{+}CD8\alpha^{-}$ Zellen produzieren IL-22 in signifikanten Ausmaßen, wohingegen die $CD8\alpha^{hi+}$ Subpopulationen zu hauptsächlichen IL-17 und IFN- γ Produzenten werden. Schulz und Kollegen (2008) beobachteten in der Maus nur einen milden Effekt von IL-17 während einer Salmonella Infektion, aber eine ergänzende wichtige Funktion von IL-17 in der IL-12/ IFN- γ Achse, welche essentiell für den Aufbau einer schützenden Immunität gegen Salmonellen einnimmt. Es gibt darüber hinaus Beweise, dass IL-17⁺ Zellen normalerweise kein IFN- γ produzieren (Roark et al., 2008). Es wurde bereits mehrfach für murine $\gamma\delta$ -T-Zellen gezeigt, dass IL-17 produzierende Zellen zumeist $CD44^{+}CD25^{+}$ sind, während $CD25^{-}$ Zellen IFN- γ sekretieren (Shibata et al., 2008, Jeong-Su Do et al., 2010; Lombes et al., 2015). Die vorliegende Arbeit enthält widersprüchliche Daten, die IL-17 produzierende $CD8\alpha^{-}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen nachwies, die mehrheitlich $CD25^{-}$ sind. Des Weiteren fanden wir eine simultane mRNA Transkription von IL-17 und IFN- γ in $CD8\alpha^{+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die sortierten $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen immer aus einer Mischung von $CD25^{+}$ und $CD25^{-}$ Zellen bestand, die je nach Zeitpunkt in ihren Verhältnissen variierten. Eine Untersuchung dieser Zusammenhänge und der einzelnen Subpopulationen muss in

4. Diskussion

zukünftigen Experimenten weiter ausgebaut werden. Trotz allem weisen Ergebnisse dieser Arbeit bereits auf eine klare funktionelle Differenz zwischen CD8 α ⁻ und CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen hin.

Zusätzlich zu diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit ein beträchtlicher Anstieg der IL-2 mRNA Expression in TCR1^{hi}CD8 α ^{lo} Zellen nach 120 h SE-stimulierter Kultur nachgewiesen. IL-2 wird normalerweise von CD4⁺ T Helferzellen produziert und begünstigt die T-Zellproliferation, das Überleben und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Bayer et al., 2013; Liao et al., 2013). Eine IL-2 Sekretion von CD8⁺ T Zellen des Menschen besitzen nachweislich mit einer konstitutiven schwachen CD25-Expression und dem Fehlen von regulatorischen Eigenschaften einen „memory-like“ Phänotyp (Herndler-Brandstetter et al., 2005). TCR1^{hi}CD8 α ^{lo} Zellen sind die einzigen $\gamma\delta$ -T-Zellen, die zu fast 100 % schwach bis stark positiv für CD25 sind und die in ältern Tieren vermehrt beobachtet wurden. Interessanterweise gibt es ebenfalls Beweise für eine IL-2 Expression in Gedächtnis-Vorläuferzellen beim Schwein (Sarker et al., 2008), die wiederum unsere Hypothese eines „Memory“ Phänotyps der TCR1^{hi}CD8 α ^{lo} Zellen stützen.

4.5 Hypothetische Differenzierung von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes

Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur und allen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, vermute ich einen Differenzierungsprozess von $\gamma\delta$ -T-Zellen unter dem Einfluss von IL-2 und *Salmonella* Enteritidis, der im folgenden Abschnitt näher erläutert wird. Einen besonderen Status nehmen dabei die CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen ein, die ihrerseits aus mehreren Subpopulationen bestehen.

Nach der Stimulation mit IL-2 und S. Enteritidis kommt es zu einer Aktivierung der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen, die durch eine Expression von CD25 und CD44 gekennzeichnet ist. Diese aktivierten Zellen beginnen rasch mit der Synthese hoher Mengen von IFN- γ , IL-17 sowie IL-22, welche die T Zellen nicht nur als T Helfer Typ 1 (T_H1) Zellen, sondern ebenso als T_H17 charakterisiert. Die Zytokinexpression der einzelnen $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation ist daher verschieden, aber dennoch verwandt. Einige Quellen gestehen den CD8⁺ T-Zellen eine ausgeprägte Zytokinexprproduktion und eine große funktionelle Heterogenität zu, die mit den T-Helfersubtypen der CD4⁺ Linie vergleichbar ist (Mittrücker et al., 2014). Eine Distanzierung von alten, starren Einteilung scheint insbesondere für $\gamma\delta$ -T-Zellen sinnvoll, da der klassische CD4⁺ T-Zelltyp bei diesen phylogenetisch älteren T-Zellen fehlt.

CD8 α ^{hi} $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen im Infektionsverlauf die hauptsächlichen IFN- γ Produzenten zu sein. Zusätzlich zur Zytokinproduktion beginnen diese Zellen eine deutliche Proliferation, in dessen Verlauf die Expression des $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors (TCR1) und des CD8 α Co-Rezeptors hoch reguliert wird und der „high affinity“ IL-2-Rezeptor (gekennzeichnet durch CD25) allmählich verschwindet. Vermutlich daraus resultierend ist die TCR1^{hi}CD8 α ^{hi} Subpopulation, die einen „memory-like“ Phänotyp besitzt. In einer

4. Diskussion

Langzeitzellkultur der $\gamma\delta$ -T-Zellen unter IL-2 Stimulation kam es zu einer exzessiven Proliferation der $CD8\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellen und einer darauffolgenden massiven Apoptose, die zur Folge hatte, dass nach 28 Tagen nur noch $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{hi+}$ Zellen übrig waren. Diese Beobachtungen stützen eine Gedächtnisdifferenzierung dieser Zellen.

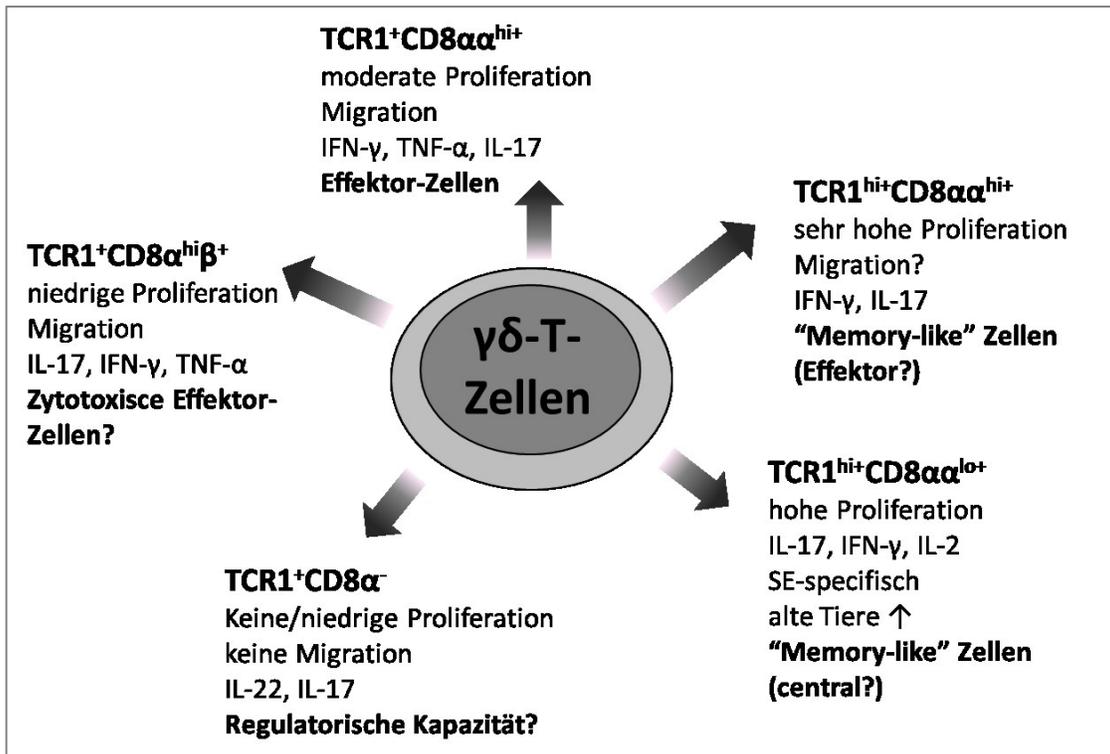


Abb. 27: Zusammenfassende Darstellung über die hypothetischen Funktionen der einzelnen aviären $\gamma\delta$ -Zellsubpopulationen in Antwort auf eine Stimulation mit *Salmonella* Enteritidis.

Eine zweite „memory-like“ Subpopulation scheinen die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ Zellen zu sein, die sich ebenfalls erst im Verlauf der Kultur entwickelten. Die Differenzierung von Gedächtnispopulationen ist bis heute nicht vollständig verstanden. Faktoren, die zur Entsehung von Gedächtnis-T-Zellen beitragen, sind a) die Stärke des TCR-vermittelten Signals, b) die Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, c) metabolische Regulation, d) asymmetrische Zellteilungen und e) eine Chromatin-Reorganisation (Valbon et al., 2016). Zudem können „effector memory“ und „central memory“ T-Zellen unterschieden werden, die durch Expression von spezifischen Zytokinrezeptoren gekennzeichnet sind und unterschiedliche Differenzierungsstadien aufweisen (Sallusto et al., 2004; Belz und Masson, 2010; Gerner et al., 2015). Die $TCR1^{hi+}CD8\alpha^{lo+}$ Population weist unter den $\gamma\delta$ -T-Zellen eine einzigartige IL-2 Expression auf, welche auch in humanen „central memory“ T-Zellen beschrieben wurde. Vielleicht wird ein längeres Überleben der

4. Diskussion

Zellen durch Expression des CD8 $\alpha\alpha$ Co-Rezeptors mit einer erhöhten Antigenerkennung durch Überexpression des TCR ergänzt. Diese Zellen haben vermutlich einen differenzierteren Phänotyp.

Zusätzlich entwickeln alle CD8 $\alpha\alpha^{hi+}$ $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach 5 Tagen SE-Stimulation eine MHC-II Expression, die auf eine Fähigkeit zur Antigenpräsentation hindeutet. Die TCR1⁺CD8 $\alpha^{hi}\beta^+$ Zellpopulation bleibt auch am Ende dieser Arbeit die geheimnisvollste. Sie zeigt nur eine schwache Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion in Antwort auf Salmonellen. Diese Zellen könnten die zytotoxische Linie innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Zellfamilie sein, aber dies muss ebenfalls in zukünftigen Arbeiten beleuchtet werden.

4.6 Unterschiede zwischen Hühnerlinien und verschiedenen Altersgruppen

In den durchgeführten Untersuchungen zur Gedächtnisfunktion aviärer $\gamma\delta$ -T-Zellen sind Unterschiede in der Immunantwort zwischen sehr jungen und erwachsenen Tieren aufgefallen. Während bei sehr jungen Tieren alle $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen eine starke Proliferation nach Immunisierung bzw. *in-vitro* Stimulation mit *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis zeigten, proliferierten bei älteren Tieren nach der immunologischen Reifung nur noch CD8 $\alpha\alpha^+$ Subpopulationen. Auch die beobachtete Gedächtnisleistung der TCR1^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen trat nur bei erwachsenen Tieren im Alter von 36 Wochen nach Immunisierung und zweimaliger Booster-Immunisierung im Alter von 3 Wochen und 21 Wochen auf. Diese Daten belegen erneut eine bereits alte Kenntnis zur Notwendigkeit einer weiteren Booster-Immunisierung am Tag 21 des Lebens. Unsere Daten weisen auf einen Spezialisierungsprozess der $\gamma\delta$ -T-Zellen während der immunologischen Reifung der Tiere hin. Eine altersabhängige Immunantwort gegen eine *S. Typhimurium* Infektion bei Broiler Hähnen wurde bereits durch eine spezifischere Proliferation und Antikörper-Produktion in älteren Tieren gezeigt (Beal et al., 2004). Die gleiche Gruppe berichtete weiterhin Unterschiede zwischen *Salmonella* sensiblen bzw. resistenten Linien. Während bei einer Infektion im Alter von 10 Tagen beide Linien gleich sensibel reagierten, zeigte die resistentere Linie eine höhere Resistenz gegenüber einer Infektion, wenn die Tiere bereits erwachsen waren (Beal et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Proliferation von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen bei Tieren unterschiedlichen Alters untersucht. Bisher gab es lediglich Hinweise auf eine erhöhte Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach PMA Stimulation von Lymphozyten von jungen Kälbern im Gegensatz zu Jungstieren, wobei die Zellen der Kälber ebenfalls stärker reagierten (Foote et al., 2005). Einen Alterseinfluss bei der Mitogen-stimulierten Proliferation verschiedener T-Zelltypen ist ebenfalls in der Maus bekannt (Grossmann et al., 1991; Xie et al., 2017).

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen erstmals auf eine stärkere, aber deutlich unspezifischere $\gamma\delta$ -T-Zellantwort gegen Salmonellen bei jungen Hühnern hin, wohingegen eine reguliertere und hoch spezifische Immunantwort einzelnen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen in älteren, immunologisch gereiften Tieren auftritt. Diese Beobachtungen heben den Bedarf einer Booster-Immunisierung von älteren Hühnern hervor, da das Immunsystem von Jungtieren nicht in der Lage ist einen ausreichenden Schutz gegen eine *Salmonella* Infektion aufzubauen.

Studien der vorliegenden Arbeit beinhalten zum ersten Mal den Vergleich der Immunreaktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen unterschiedlicher Hühnerlinien. Dabei untersuchten wir zum einen die $\gamma\delta$ -T-Zell-Antwort nach unspezifischer Mitogen-induzierter Stimulation und zum anderen nach Immunisierung und Stimulation mit einem *Salmonella* Enteritidis Lebendimpfstamm (SEvac) und einem Wildtyp Stamm (SE147).

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Annahme, dass Genotypen mit hoher Legeleistung eine reduzierte Kapazität haben, Änderungen der Umwelteinflüsse zu kompensieren. Dazu gehört auch die Herausforderung einer Infektion.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur $\gamma\delta$ -T-Zellantwort nach Mitogenstimulation oder *Salmonella* Enteritidis Stimulation konnten keine leistungsassoziierten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Hühnerlinien belegen. Hingegen scheint die durch die Evolution gegebene genetische Vielfalt von größerer Bedeutung für die Immunkompetenz der Hühner zu sein. Es wurden bereits mehrfach signifikante Unterschiede in der Immunkompetenz gegenüber bakteriellen, viralen oder parasitären Infektionen beim Huhn gefunden (Kim et al., 2008; Sironi et al., 2008; Coble et al., 2011; Norup et al., 2011; Tippenhauer et al., 2012; Dong et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit zeigten vor allem die $\gamma\delta$ -T-Zellen der weißen Linien eine höhere proliferative Aktivität, wobei die weiße Hochleistungslinie WLA stets am meisten hervorstach. Zudem tritt die vermutete Gedächtniszellpopulation der $\text{TCR1}^{\text{hi+}}\text{CD8}\alpha^{\text{hi+}}$ Zellen vermehrt in weißen Linien auf und zeigt vor allem bei WLA Hühnern eine „memory-like Recall Proliferation“.

Darüber hinaus zeigten Zellen der WLA in allen Versuchen eine herausragende und einzigartige Reaktion in Bezug auf die $\gamma\delta$ -T-Zellproliferation, wodurch auch nur diese Linie für tiefer gehende funktionelle Analysen der $\gamma\delta$ -T-Zellen ausgewählt wurde. Was diese Unterschiede für die einzelnen Legehennen-Linien im Zusammenhang mit einer *Salmonella* Infektion bedeuten, bleibt in weiteren Experimenten zu klären.

4. Diskussion

4.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich neben der funktionellen Charakterisierung der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen zudem mit dem Vergleich von vier verschiedenen Legehennenlinien bezüglich ihrer immunologischen Kompetenz auf $\gamma\delta$ -Zellebene.

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte ein solides Zellkulturverfahren etabliert werden, mit dem die isolierten Primärzellen des Blutes gut über mehrere Tage kultiviert werden können. Um die Erhaltung der Zellen bzw. ihre Vermehrung für weiterführende Experimente noch weiter zu steigern, müssten in Zukunft weitere Versuche im Zusammenhang mit optimalen Zytokinkonzentrationen oder anderen Medienzusätzen durchgeführt werden.

In Hinsicht auf Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen konnten in der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse gewonnen werden, die jedoch in weiterführenden Versuchen weiter belegt werden müssen. Die neu definierten Subpopulationen müssen mit Hilfe weiterer Marker validiert und genauer charakterisiert werden. Da für die Genexpressionsanalysen der Zytokine aufgrund sehr geringer Zellzahlen oftmals mehrere Proben gepoolt werden mussten, sollten diese Untersuchungen an weiteren Tieren wiederholt werden. Zudem könnten ausstehende Analysen der Zytokinexpression auf Proteinlevel zum Beispiel mit Hilfe von ELISAs durchgeführt werden.

Eine mögliche Antigenexpression der $\gamma\delta$ -T-Zellen könnte mittels Co-Kulturen von vorstimulierten „Antigen experienced“ Zellen und naiven, frischen Zellen untersucht werden. Dazu müssten aber jeweils reine $\gamma\delta$ -T-Zellisolate hergestellt werden, um den Einfluss anderer Zellen auszuschließen. Welche $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation tatsächlich zytotoxische Merkmale aufweist, wurde in der vorliegenden Arbeit begonnen zu untersuchen. Jedoch waren die ersten Ergebnisse sehr heterogen und aus Mangel an Zeit nicht wiederholbar. Es wurde dazu eine primäre aviäre Darmepithelzelllinie verwendet, die mit Salmonellen infiziert schlussendlich mit reinen $\gamma\delta$ -T-Zellen ko-kultiviert wurde. Nach einer weiteren Etablierung der Infektionsraten, Inkubationszeiten und Zellzahlverhältnisse könnten diese Versuche ebenfalls fortgeführt werden. Um die Daten der Durchflusszytometrie zu bekräftigen, sollten zudem Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt werden. Dabei kann die Interaktion von Zellen bezüglich Antigenexpression bzw. Zytotoxizität beleuchtet werden. Des Weiteren können im FACS gefundene Marker nochmals bildlich auf der Zelloberfläche dargestellt werden, um deren Validität zu verstärken.

Literaturverzeichnis

1. Alvarez AJ, Endsley JJ, Werling D, Mark Estes D. 2009. WC1(+) gammadelta T cells indirectly regulate chemokine production during mycobacterium bovis infection in SCID-bo mice. *Transbound Emerg Dis.* 56(6-7):275-84.
2. Arstila TP, Lassila O. 1993. Androgen-induced expression of the peripheral blood gamma delta T cell population in the chicken. *J Immunol.* 151(12):6627-33
3. Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA. 2004. Salmonella enteritidis clearance and immune responses in chickens following Salmonella vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 101(3-4):251-7.
4. Bachmann MF, Wolint P, Walton S, Schwarz K, Oxenius A. 2007. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol.* 37(6):1502-12.
5. Bai SP, Huang Y, Luo YH, Wang LL, Ding XM, Wang JP, Zeng QF, Zhang KY., 2014. Alteration in lymphocytes responses, cytokine and chemokine profiles in laying hens infected with Salmonella Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol.* 160(3-4):235-43.
6. Baldwin CL, Telfer JC. 2015. The bovine model for elucidating the role of $\gamma\delta$ T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol Immunol.* 66(1):35-47.
7. Barnaba V, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A. 1994. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol.* 24(1):71-5.
8. Barrow PA, Bumstead N, Marston K, Lovell MA, Wigley P. 2004. Faecal shedding and intestinal colonization of Salmonella enterica in in-bred chickens: the effect of host-genetic background. *Epidemiol Infect.* 132(1):117-26.
9. Barrow PA, Methner U. 2013 Vaccination against Salmonella infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: *Salmonella in Domestic Animals*, 2nd ed. Wallingford (UK): CABI International p. 455–75.
10. Bayer AL, Pugliese A, Malek TR. 2013. The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation. *Immunol Res.* 57(1-3):197-209.
11. Beal RK, Powers C, Wigley P, Barrow PA, Smith AL. 2004. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Avian Pathol.* 33(1):25-33.
12. Beal RK, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA, Smith AL. 2004. Age at primary infection with

Literaturverzeichnis

- Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 100(3-4):151-64.
13. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. 2008. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology.* 213(3-4):173-82.
 14. Belz GT, Masson F. 2010. Interleukin-2 tickles T cell memory. *Immunity.* 29;32(1):7-9.
 15. Bendali-Ahcène S, Cadore JL, Fontaine M, Monier JC. 1997. Anti-alpha chain monoclonal antibodies of equine MHC class-II antigens: applications to equine infectious anaemia. *Res Vet Sci.* 62(2):99-104.
 16. Berndt A, Müller J, Borsi L, Kosmehl H, Methner U, Berndt A. 2009. Reorganisation of the caecal extracellular matrix upon Salmonella infection-relation between bacterial invasiveness and expression of virulence genes. *Vet Microbiol.* 133(1-2):123-37.
 17. Berndt A, Pieper J, Methner U. 2006. Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. *Infect Immun.* 74(7):3967-78.
 18. Berndt A, Methner U. 2001. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated Salmonella typhimurium strains. *Vet Immunol Immunopathol.* 26;78(2):143-61.
 19. Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U. 2007. Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness. *Infect Immun.* 75(12):5993-6007.
 20. Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Bécourt C, Lucas B. 2005. Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol.* 175(1):246-53.
 21. Blumerman SL, Herzig CT, Baldwin CL. 2007. WC1+ gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. *Eur J Immunol.* 37(5):1204-16.
 22. Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. 2006. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 18(1):31-8.
 23. Boyman O, Cho JH, Sprent J. 2010. The role of interleukin-2 in memory CD8 cell differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 684:28-41.
 24. Boyman O, Krieg C, Homann D, Sprent J. 2012. Homeostatic maintenance of T cells and natural killer cells. *Cell Mol Life Sci.* 69(10):1597-608.
 25. Brandes M, Willimann K, Moser B. 2005. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science.* 8;309(5732):264-8.
 26. Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, Tampé R, Lévy F, Romero P, Moser B., 2009. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;106(7):2307-12.

Literaturverzeichnis

27. Braukmann M, Methner U, Berndt A. 2015. Avian CD25(+) gamma/delta ($\gamma\delta$) T cells after Salmonella exposure. *Vet Immunol Immunopathol.* 168(1-2):14-8.
28. Buza J, Kiros T, Zerihun A, Abraham I, Ameni G. 2009. Vaccination of calves with Mycobacteria bovis Bacilli Calmete Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood gammadelta T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 130(3-4):251-5.
29. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, Sireci G, Fournié JJ, Dieli F. 2011. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. *Blood.* 7;118(1):129-38.
30. Cantrell DA. 2002. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology.* 105(4):369-74.
31. Castro I, Dee MJ, Malek TR. 2012. Transient enhanced IL-2R signaling early during priming rapidly amplifies development of functional CD8+ T effector-memory cells. *J Immunol.* 189(9):4321-30.
32. Carding SR, Kyes S, Jenkinson EJ, Kingston R, Bottomly K, Owen JJ, Hayday AC. 1990. Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression. *Genes Dev.* 4(8):1304-15.
33. Carding SR, Egan PJ. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2(5):336-45.
34. Carvajal BG, Methner U, Pieper J, Berndt A. 2008. Effects of Salmonella enterica serovar Enteritidis on cellular recruitment and cytokine gene expression in caecum of vaccinated chickens. *Vaccine* 26:5423–33.
35. Chang JT, Wherry EJ, Goldrath AW. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol.* Dec;15(12):1104-15.
36. Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P, 2009. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;128(1-3):53-9.
37. Chen, C., Yao, S., Huang, D., Wei, H., Sicard, H., Zeng, G., Jomaa, H., Larsen, M., Jacobs, W.J., Wang, R., Letvin, N., Shen, Y., Qiu, L., Shen, L., Chen, Z. 2013. Phosphoantigen/IL2 expansion and differentiation of $V\gamma 2V\delta 2$ T cells increase resistance to tuberculosis in nonhuman primates. *PLoS Pathog.* 9.
38. Chien YH, Konigshofer Y. 2007. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev.* 215:46-58.
39. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. 2014 $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol.* 32:121-55.
40. Choi KD, Lillehoj HS. 2000. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 73(3-4):309-21.

Literaturverzeichnis

41. Coble DJ, Redmond SB, Hale B, Lamont SJ. 2011. Distinct lines of chickens express different splenic cytokine profiles in response to *Salmonella* Enteritidis challenge. *Poult Sci.* 90(8):1659-63.
42. Collins RA, Werling D, Duggan SE, Bland AP, Parsons KR, Howard CJ., 1998. Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells. *J Leukoc Biol.* 63(6):707-14.
43. Colpitts SL, Puddington L, Lefrançois L., 2015. IL-15 receptor α signaling constrains the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(31):9692-7.
44. Cooper GL1, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE, 1993. Further studies of the application of live *Salmonella enteritidis aroA* vaccines in chickens. *Vet Rec.* 10;133(2):31-6.
45. Cua DJ, Tato CM., 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 10(7):479-89.
46. Cui W, Kaech SM., 2010. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev.* 236:151-66.
47. Curtsinger JM, Mescher MF. 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 22(3):333-40.
48. D'Souza WN, Hedrick SM. 2006. Cutting edge: latecomer CD8 T cells are imprinted with a unique differentiation program. *J Immunol.* 2006 Jul 15;177(2):777-81.
49. Dai Z, Konieczny BT, Lakkis FG. 2000. The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8+ memory T cells. *J Immunol.* 165(6):3031-6.
50. Dalton JE, Cruickshank SM, Egan CE, Mears R, Newton DJ, Andrew EM, Lawrence B, Howell G, Else KJ, Gubbels MJ, Striepen B, Smith JE, White SJ, Carding SR. 2006. Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. *Gastroenterology.* 131(3):818-29.
51. Del Prete G., 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol.* 16(3-4):427-55.
52. Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. 2003. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 60(12):2604-21.
53. Desin TS, Köster W, Potter AA. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vacc* 12:87–96.
54. Do JS, Fink PJ, Li L, Spolski R, Robinson J, Leonard WJ, Letterio JJ, Min B. 2010. Cutting edge: spontaneous development of IL-17-producing gamma delta T cells in the thymus occurs via a TGF-beta 1-dependent mechanism. *J Immunol.* 15;184(4):1675-9.

Literaturverzeichnis

55. Dodd J, Riffault S, Kodituwakku JS, Hayday AC, Openshaw PJ. 2009. Pulmonary V gamma 4+ gamma delta T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease. *J Immunol.* 182(2):1174-81.
56. Dong P, Ju X, Yan Y, Zhang S, Cai M, Wang H, Chen H, Hu Y, Cui L, Zhang J, He W. 2018. $\gamma\delta$ T Cells Provide Protective Function in Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza A Virus Infection. *Front Immunol.* 4;9:2812.
57. Dong P, Zhang S, Cai M, Kang N, Hu Y, Cui L, Zhang J, He W. 2014. Global characterization of differential gene expression profiles in mouse V γ 1+ and V γ 4+ $\gamma\delta$ T cells. *PLoS One.* 18;9(11): e112964.
58. Doveren RF, van der Linden CJ, Spronken EE, Groenewegen G, Buurman WA. 1986. Canine MHC-class II antigens on B and T lymphocytes. *Tissue Antigens.* 27(2):87-98.
59. Dudley EC, Girardi M, Owen MJ, Hayday AC. 1995. Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Current Biology.* 5:659–669.
60. Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Estebas L, Doherty DG. 2010. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human V γ 9V δ 2 T cells. *Mediators Inflamm.* 2010:704941.
61. Dunon D, Courtois D, Vainio O, Six A, Chen CH, Cooper MD, Dangy JP, Imhof BA. 1997. Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J Exp Med.* 6;186(7):977-88.
62. Eberl M, Engel R, Beck E, Jomaa H. 2002. Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol.* 218(1-2):1-6.
63. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C., 2010. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol.* (9):354-61.
64. Fairhurst RM, Daeipour M, Amaral MC, Nel AE. 1993. Activation of mitogen-activated protein kinase/ERK-2 in phytohaemagglutinin in blasts by recombinant interleukin-2: contrasting features with CD3 activation. *Immunology.* 79(1):112-8.
65. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. 2014. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 14(1):24-35.
66. Ferreira LM, 2013. Gammadelta T cells: innately adaptive immune cells? *Int Rev Immunol.* 32(3):223-48.
67. Fikri, Y., Pastoret, P., Nyabenda, J., 2002, Costimulatory Molecule Requirement for Bovine WC1+ gamma/delta T cells`Proliferative Response to bacterial Superantigens. *Scand. J Immunol* 55, 373-381.

Literaturverzeichnis

68. Foote MR, Nonnecke BJ, Fowler MA, Miller BL, Beitz DC, Waters WR. 2005. Effects of age and nutrition on expression of CD25, CD44, and L-selectin (CD62L) on T-cells from neonatal calves. *J Dairy Sci.* 88(8):2718-29.
69. Gaffen SL, Liu KD. 2004. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine.* 28(3):109-23.
70. García, V., Jullien, D., Song, M., Uyemura, K., Shuai, K., Morita, C., Modlin, R., 1998, IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens. *J Immunol* 160, 4322-4329.
71. Gerner W, Käser T, Saalmüller A. 2009. Porcine T lymphocytes and NK cells--an update. *Dev Comp Immunol.* 33(3):310-20.
72. Gerner W, Talker SC, Koinig HC, Sedlak C, Mair KH, Saalmüller A. 2015. Phenotypic and functional differentiation of porcine $\alpha\beta$ T cells: current knowledge and available tools. *Mol Immunol.* 66(1):3-13.
73. Girardi M, 2006. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol.* 126(1):25-31.
74. Grossmann A, Maggio-Price L, Jinneman JC, Rabinovitch PS. 1991. Influence of aging on intracellular free calcium and proliferation of mouse T-cell subsets from various lymphoid organs. *Cell Immunol.* 135(1):118-31.
75. Guzman E, Montoya M. 2018. Contributions of Farm Animals to Immunology. *Front Vet Sci.* 2018 Dec 6;5:307.
76. Guzman E, Price S, Poulosom H, Hope J. 2012. Bovine $\gamma\delta$ T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet Immunol Immunopathol.* 148(1-2):161-7.
77. Hanieh, H., Narabara, K., Tanaka, Y., Gu, Z., Abe, A., Kondo, Y. 2012, Immunomodulatory effects of Alliums and Ipomoea batata extracts on lymphocytes and macrophages functions in White Leghorn chickens: In vitro study. *Anim Sci J.* 83, 68–76.
78. Hara T, Mizuno Y, Takaki K, Takada H, Akeda H, Aoki T, Nagata M, Ueda K, Matsuzaki G, Yoshikai Y, 1992. Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection. *J Clin Invest.* 90(1):204-10.
79. Hartwig T, Pantelyushin S, Croxford AL, Kulig P, Becher B, 2015. Dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells establish long-lived memory in the skin. *Eur J Immunol.* 45(11):3022-33.
80. Harty JT, Badovinac VP. 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 8(2):107-19.

Literaturverzeichnis

81. Hassan JO, Curtiss R 3rd. 1996. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* on immunity of progeny challenged with wild-Type *Salmonella* strains. *Infect Immun.* 64(3): 938–944.
82. Hayday, A.C. 2000. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol.* 18, 975-1026.
83. Hayday A, Viney JL, 2000. The ins and outs of body surface immunology. *Science.* 290(5489):97-100.
84. Hayday A, Gibbons D. 2008. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. *Mucosal Immunol.* 1(3):172-4.
85. Hayday, AC. 2009. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 31(2):184-96.
86. Hayes SM, Love PE. 2007. A retrospective on the requirements for gammadelta T-cell development. *Immunol Rev.* 215:8-14.
87. Hedges JF, Buckner DL, Rask KM, Kerns HM, Jackiw LO, Trunkle TC, Pascual DW, Jutila MA. 2007. Mucosal lymphatic-derived gammadelta T cells respond early to experimental *Salmonella* enterocolitis by increasing expression of IL-2R alpha. *Cell Immunol.* 246(1):8-16.
88. Herndler-Brandstetter D, Schwaiger S, Veel E, Fehrer C, Cioca DP, Almanzar G, Keller M, Pfister G, Parson W, Würzner R, Schönitzer D, Henson SM, Aspinall R. 2005. Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstein B. 2005. CD25-expressing CD8+ T cells are potent memory cells in old age. *J Immunol.* 175(3):1566-74.
89. Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, Vernay B, Saraiva L, Wu Y, Cohen CJ, Gustafsson K, Anderson J. 2012. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol.* 15;188(4):1708-16.
90. Holderness, J., Hedges, J., Ramstead, A., Jutila, M., 2013, Comparative Biology of $\gamma\delta$ T Cell Function in Humans, Mice, and Domestic Animals. *Ann Rev Anim Biosci* 1, 99–124.
91. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. 2004. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol.* 65(4):282-90.
92. Holtmeier W, Kabelitz D., 2005. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy.* 86:151-83.
93. Howard ZR, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC. 2012. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. *Food Res Int.* 45:755–64.
94. Huang Y, Wange RL. 2004. T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J Biol Chem.* 279(28):28827-30.

Literaturverzeichnis

95. Isaacson JA, Flaming KP, Roth JA. 1998. Increased MHC class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 64(3):235-48.
96. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. 2015. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun.* 60:1-11.
97. Isakov, N., Altman, A. 2002. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 20, 761-794.
98. Isakov, N., Altman, A. 2012. PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/CD28 surface receptors. *Front Immunol.* 3.
99. Jameson JM, Cruz J, Costanzo A, Terajima M, Ennis FA. 2010. A role for the mevalonate pathway in the induction of subtype cross-reactive immunity to influenza A virus by human gammadelta T lymphocytes. *Cell Immunol.* 264(1):71-7.
100. Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M. 2011. Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. *Immunol Rev.* 240(1):185-95.
101. Jawale CV, Lee JH. 2014. Characterization of adaptive immune responses induced by a new genetically inactivated *Salmonella Enteritidis* vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 37(3):159-67.
102. Johnston CE, Hartley C, Salisbury AM, Wigley P. 2012. Immunological changes at point-of-lay increase susceptibility to *Salmonella enterica* Serovar enteritidis infection in vaccinated chickens. *PLoS One.* 7(10):e48195.
103. Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D. 2000. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 122(1):1-7.
104. Kabelitz D, He W. 2012. The multifunctionality of human V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T cells: clonal plasticity or distinct subsets? *Scand J Immunol.* 76(3):213-22.
105. Kaech SM, Cui W. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 12(11):749-61.
106. Kaiser MG, Cheeseman JH, Kaiser P, Lamont SJ. 2006. Cytokine expression in chicken peripheral blood mononuclear cells after in vitro exposure to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poult Sci.* 85(11):1907-11.
107. Kalia V, Sarkar S, Subramaniam S, Haining WN, Smith KA, Ahmed R. 2010. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity.* 32(1):91-103.
108. Kano R, Konnai S, Onuma M, Ohashi K. 2009. Microarray analysis of host immune responses to

Literaturverzeichnis

- Marek's disease virus infection in vaccinated chickens. *J Vet Med Sci.* 71(5):603-10.
109. Kasahara, Y., Chen, C., Cooperao, M.. 1993. Growth requirements for avian $\gamma\delta$ T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming. *Eur. J Immunol* 23, 2230-2236.
110. Kalyan S, Kabelitz D. 2013. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol.* 10(1):21-9.
111. Khairallah C, Chu TH, Sheridan BS. 2018. Tissue Adaptations of Memory and Tissue-Resident Gamma Delta T Cells. *Front Immunol.* 27;9:2636.
112. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. 2006. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol.* 18(6):670-5.
113. Kim DK, Hong YH, Park DW, Lamont SJ, Lillehoj HS. 2008. Differential immune-related gene expression in two genetically disparate chicken lines during infection by *Eimeria maxima*. *Dev Biol (Basel).* 132:131-40.
114. Kokab A, Jennings R, Eley A, Pacey AA, Cross NA. 2010. Analysis of modulated gene expression in a model of Interferon-gamma-induced persistence of *Chlamydia trachomatis* in HEp-2 cells. *Microb Pathog.* 49(5):217-25.
115. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Blessenohl M, Westermann J, Zeitz M, Loddenkemper C, Hoffmann JC. 2009. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology.* 128(4):580-8.
116. Lalor SJ, McLoughlin RM. 2016. Memory $\gamma\delta$ T Cells-Newly Appreciated Protagonists in Infection and Immunity. *Trends Immunol.* 37(10):690-702.
117. Lan, R., Selmi, C., Gershwin, M. 2008. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J Autoimmun* 31, 7-12.
118. Lauritsen JP, Wong GW, Lee SY, Lefebvre JM, Ciofani M, Rhodes M, Kappes DJ, Zúñiga-Pflücker JC, Wiest DL. 2009. Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the gammadelta T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. *Immunity.* 31(4):565-75.
119. Lauvau G, Boutet M, Williams TM, Chin SS, Chorro L. 2016. Memory CD8(+) T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends Immunol.* 37(6):375-385.
120. Lavoie ET, Grasman KA. 2005. Isolation, cryopreservation, and mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from chickens (*Gallus domesticus*) and wild herring gulls (*Larus argentatus*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 48(4):552-8.
121. Li J, Huang ZF, Xiong G, Mo HY, Qiu F, Mai HQ, Chen QY, He J, Chen SP, Zheng LM, Qian CN, Zeng YX. 2011. Distribution, characterization, and induction of CD8+ regulatory T cells and IL-17-producing CD8+ T cells in nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med.* 4;9:189.

Literaturverzeichnis

122. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2011. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 23(5):598-604.
123. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2013. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity.* 38(1):13-25
124. Lieboldt MA, Frahm J, Halle I, Schrader L, Weigend S, Preisinger R, Breves G, Dänicke S. 2016. Haematological and febrile response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide in 12-week-old cockerels of genetically diverse layer lines fed diets with increasing L-arginine levels. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 101(4):743-754.
125. Lieboldt MA, Frahm J, Halle I, Görs S, Schrader L, Weigend S, Preisinger R, Metges CC, Breves G, Dänicke S. 2016. Metabolic and clinical response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide in layer pullets of different genetic backgrounds supplied with graded dietary L-arginine. *Poult Sci.* 95(3):595-611.
126. Liu H, Leung BP. 2006. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33(5-6):519-24.
127. Lombes A, Durand A, Charvet C, Rivière M, Bonilla N, Auffray C, Lucas B, Martin B. 2015. Adaptive Immune-like γ/δ T Lymphocytes Share Many Common Features with Their α/β T Cell Counterparts. *J Immunol.* 195(4):1449-58.
128. Luhtala M. 1998. Chicken CD4, CD8 α beta, and CD8 α alpha T cell co-receptor molecules. *Poult Sci.* 77(12):1858-73.
129. Madakamutil LT, Christen U, Lena CJ, Wang-Zhu Y, Attinger A, Sundarrajan M, Ellmeier W, von Herrath MG, Jensen P, Littman DR, Cheroutre H. 2004. CD8 α alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science.* 304(5670):590-3.
130. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 43(11):2797-809.
131. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. 2009. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity.* 31(2):321-30.
132. Matulova M, Stepanova H, Sisak F, Havlickova H, Faldynova M, Kyrova K, Volf J, Rychlik I. 2012. Cytokine signaling in splenic leukocytes from vaccinated and non-vaccinated chickens after intravenous infection with *Salmonella enteritidis*. *PLoS One.* 7(2):e32346.
133. McKenzie DR, Kara EE, Bastow CR, Tyllis TS, Fenix KA, Gregor CE, Wilson JJ, Babb R, Paton JC, Kallies A, Nutt SL, Brüstle A, Mack M, Comerford I, McColl SR. 2017. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells switch migratory patterns between resting and activated states. *Nat Commun.* 5;8:15632.
134. McNicol AM, Bendle G, Holler A, Matjeka T, Dalton E, Rettig L, Zamoyska R, Uckert W, Xue SA, Stauss

Literaturverzeichnis

- HJ. 2007. CD8alpha/alpha homodimers fail to function as co-receptor for a CD8-dependent TCR. *Eur J Immunol.* 37(6):1634-41.
135. Meissner N, Radke J, Hedges JF, White M, Behnke M, Bertolino S, Abrahamsen M, Jutila MA. 2003. Serial analysis of gene expression in circulating gamma delta T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J Immunol.* 170(1):356-64.
136. Methner U. 2018. Immunisation of chickens with live *Salmonella* vaccines - Role of booster vaccination. *Vaccine.* 36(21):2973-2977.
137. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol.* 11:245-68.
138. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. 2014. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 62(6):449-58.
139. Mixer PF, Camerini V, Stone BJ, Miller VL, Kronenberg M. 1994. Mouse T lymphocytes that express a gamma delta T-cell antigen receptor contribute to resistance to *Salmonella* infection in vivo. *Infect Immun.* 62(10):4618-21.
140. Moser B, Eberl M., 2007. gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 215:89-102.
141. Murphy AG, O'Keeffe KM, Lalor SJ, Maher BM, Mills KH, McLoughlin RM. 2014. *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory $\gamma\delta$ T cells that are protective against subsequent infection. *J Immunol.* 192(8):3697-708.
142. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. 2001. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun.* 69(12):7550-8.
143. Naiman BM, Blumberman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, Baldwin CL. 2002. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun.* 70(11):6147-57.
144. Nanno M, Shiohara T, Yamamoto H, Kawakami K, Ishikawa H., 2007. gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev.* 215:103-13.
145. Nii T, Isobe N, Yoshimura Y. 2015. The effect of estrogen on the early cytotoxic response to IB virus infection in hen oviduct. *Vet Immunol Immunopathol.* 164(1-2):56-66.
146. Nikhil S. Joshi and Susan M. Kaech. 2008. Effector CD8 T Cell Development: A Balancing Act between Memory Cell Potential and Terminal Differentiation. *J Immunol.* 180 (3) 1309-1315.

Literaturverzeichnis

147. Norup, L., Dalgaard, T., Pedersen, A., Juul-Madsen, H. 2011. Assessment of Newcastle disease-specific T cell proliferation in different inbred MHC chicken lines. *Scand. J Immunol* 74, 23-30.
148. Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA. 2004. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma production. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 27(4):255-72.
149. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. 2012. Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology.* 136(3):283-90.
150. Patil RS, Bhat SA, Dar AA, Chiplunkar SV. 2015. The Jekyll and Hyde story of IL17-Producing $\gamma\delta$ T Cells. *Front Immunol.* 4;6:37.
151. Paul S, Singh AK, Shilpi, Lal G. 2014. Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in inflammation and tolerance. *Int Rev Immunol.* 33(6):537-58.
152. Penha Filho RA, Moura BS, de Almeida AM, Montassier HJ, Barrow PA, Berchieri Junior A. 2012. Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella Enteritidis* challenge in chickens. *Vaccine.* 30(52):7637-43.
153. Pichler WJ, Wyss-Coray T. 1994. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today.* 15(7):312-5.
154. Pieper J, Methner U, Berndt A. 2008. Heterogeneity of avian gammadelta T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 124(3-4):241-52.
155. Pieper J, Methner U, Berndt A. 2011. Characterization of avian $\gamma\delta$ T-cell subsets after *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chicks. *Infect Immun.* 79(2):822-9.
156. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity.* 32(1):79-90.
157. Plattner BL, Hostetter JM. 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet Med Int.* 2011:214384.
158. Polasky C, Weigend S, Schrader L, Berndt A. 2016. Non-specific activation of CD8 α -characterised $\gamma\delta$ T cells in PBL cultures of different chicken lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 179:1-7.
159. Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. 2013. Functional development of $\gamma\delta$ T cells. *Eur J Immunol.* 43(8):1988-94.
160. Prlic M, Williams MA, Bevan MJ. 2007. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol.* 19(3):315-9.
161. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan PL, Lam KT, Peiris JS, Lau YL, Tu W. 2009. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis.* 200(6):858-65.

162. Quade MJ, Roth JA. 1999. Dual-color flow cytometric analysis of phenotype, activation marker expression, and proliferation of mitogen-stimulated bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol.* 67(1):33-45.
163. Ramírez-Valle F, Gray EE, Cyster JG. 2015 Inflammation induces dermal V γ 4+ $\gamma\delta$ T17 memory-like cells that travel to distant skin and accelerate secondary IL-17-driven responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(26):8046-51.
164. Ravindran R, McSorley SJ. 2005. Tracking the dynamics of T-cell activation in response to Salmonella infection. *Immunology.* 114(4):450-8
165. Reddehase, M., Saalmüller, A., Hirt, W. 1991, Gamma/delta T-lymphocyte subsets in swine. *Curr Top Microbiol Immunol.* 173, 113-117.
166. Reizis B1, Schramm C, Cohen IR, Mor F. 1994. Expression of major histocompatibility complex class II molecules in rat T cells. *Eur J Immunol.* 24(11):2796-802.
167. Ren, Z., Wang, Y., Deng, H., Deng, Y., Deng, J., Zuo, Z., Wang, Y., Peng, X., Cui, H., Shen, L., Ma, X., Fang, J. 2015. Deoxynivalenol-induced cytokines and related genes in concanavalin A-stimulated primary chicken splenic lymphocytes. *Toxicol in Vitro.* 29, 558-563.
168. Restifo NP, Gattinoni L. 2013. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol.* 25(5):556-63.
169. Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2001. Antigen recognition and immunomodulation by gamma delta T cells in bovine tuberculosis. *J Immunol.* 1;166(9):5604-10.
170. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. 2008. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol.* 20(3):353-7.
171. Rocha B, Tanchot C., 2004. CD8 T cell memory. *Semin Immunol.* 16(5):305-14.
172. Rocha B, Tanchot C. 2004. Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Opin Immunol.* 16(3):259-63.
173. Romagnani S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis.* 5(4):285-94.
174. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. 2016. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 16(2):90-101.
175. Rychlik I, Elsheimer-Matulova M, Kyrova K. 2014. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid Salmonella. *Vet Res.* 5;45:119.
176. Saalmüller, A., Hirt, W., Reddehase, M., 1990, Porcine gamma/delta T lymphocyte subsets differing in their propensity to home to lymphoid tissue. *Eur. J Immunol* 20, 2343-2346.
177. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 22:745-63.

Literaturverzeichnis

178. Sathiyaseelan, T., Baldwin, C.L. 2000, Evaluation of cell replication by bovine T cells in polyclonally activated cultures using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) loading and flow cytometric analysis. *Res Vet Sci.* 69, 275–281.
179. Schenten D, Medzhitov R. 2011. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv Immunol.* 109:87-124.
180. Schluns KS, Lefrançois L. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* 3(4):269-79.
181. Schulz SM, Köhler G, Schütze N, Knauer J, Straubinger RK, Chackerian AA, Witte E, Wolk K, Sabat R, Iwakura Y, Holscher C, Müller U, Kastelein RA, Alber G. 2008. Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. *J Immunol.* 181(11):7891-901.
182. Sedlak, C., Patzl, M., Saalmüller, A., Gerner, W. 2014. CD2 and CD8 α define porcine $\gamma\delta$ T cells with distinct cytokine production profiles. *Dev Comp Immunol.* 45, 97-106.
183. Seliger C, Schaerer B, Kohn M, Pendl H, Weigend S, Kaspers B, Härtle S. 2012. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 145(1-2):86-99.
184. Selvaraj RK. 2011. Avian CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Dev Comp Immunol.* 41(3):397-402.
185. Shanmugasundaram R1, Selvaraj RK. 2011. Regulatory T cell properties of chicken CD4+CD25+ cells. *J Immunol.* 186(4):1997-2002
186. Shanmugasundaram R1, Selvaraj RK. 2011. In vitro lipopolysaccharide treatment alters regulatory T cell properties in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 144(3-4):476-81.
187. Shanmugasundaram R1, Selvaraj RK. 2012. In vivo lipopolysaccharide injection alters CD4+CD25+ cell properties in chickens. *J Anim Sci.* 90(8):2498-504.
188. Shao L, Huang D, Wei H, Wang RC, Chen CY, Shen L, Zhang W, Jin J, Chen ZW. 2009. Expansion, reexpansion, and recall-like expansion of V γ 2V δ 2 T cells in smallpox vaccination and monkeypox virus infection. *J Virol.* 83(22):11959-65.
189. Shekhar S, Milling S, Yang X. 2012. Migration of $\gamma\delta$ T cells in steady-state conditions. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;147(1-2):1-5
190. Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, Kou Z, Wang Q, Jiang L, Estep J, Hunt R, Clagett M, Sehgal PK, Li Y, Zeng X, Morita CT, Brenner MB, Letvin NL, Chen ZW. 2002. Adaptive immune response of V γ 2V δ 2+ T cells during mycobacterial infections. *Science.* 295(5563):2255-8.
191. Sheridan BS, Romagnoli PA, Pham QM, Fu HH, Alonzo F 3rd, Schubert WD, Freitag NE, Lefrançois L.

2013. $\gamma\delta$ T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity*. 39(1):184-95.
192. Shibata K, Yamada H, Nakamura R, Sun X, Itsumi M, Yoshikai Y. 2008. Identification of CD25+ gamma delta T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers. *J Immunol*. 181(9):5940-7.
193. Sekelova Z, Polansky O, Stepanova H, Fedr R, Faldynova M, Rychlik I, Vlasatikova L1. 2017. Different roles of CD4, CD8 and $\gamma\delta$ T-lymphocytes in naive and vaccinated chickens during *Salmonella Enteritidis* infection. *Proteomics*. 17(13-14).
194. Sironi L, Williams JL, Moreno-Martin AM, Ramelli P, Stella A, Jianlin H, Weigend S, Lombardi G, Cordioli P, Mariani P. 2008. Susceptibility of different chicken lines to H7N1 highly pathogenic avian influenza virus and the role of Mx gene polymorphism coding amino acid position 631. *Virology*. 380(1):152-6.
195. Sowder, J.T., Chen, C.L., Ager, L.L., Chan, M.M., Cooper, M.D. 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 167, 315-322.
196. Spiering MJ. 2015. Primer on the Immune System. *Alcohol Res*. 37(2):171-5.
197. Springer S, Lindner T, Ahrens M, Woitow G, Prandini F, Selbitz HJ. 2011. Duration of immunity induced in chickens by an attenuated live *Salmonella enteritidis* vaccine and an inactivated *Salmonella enteritidis/typhimurium* vaccine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 124(3-4):89-93.
198. Staeheli P, Puehler F, Schneider K, Göbel TW, Kaspers B. 2001. Cytokines of birds: conserved functions-a largely different look. *J Interferon Cytokine Res*. 21(12):993-1010.
199. Stepanova K, Sinkora M. 2013. Porcine $\gamma\delta$ T lymphocytes can be categorized into two functionally and developmentally distinct subsets according to expression of CD2 and level of TCR. *J Immunol*. 190(5):2111-20
200. Straube F, Herrmann T. 2001. Differential modulation of CD8beta by rat gammadelta and alphabeta T cells after activation. *Immunology*. 104(3):252-8.
201. Sutton CE, Mielke LA, Mills KH., 2012. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol*. 42(9):2221-31.
202. Szamel, M., Resch, K., 1995, T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways Activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur J Biochem* 228, 1-15.
203. Taams LS, van Eden W, Wauben MH. 1999. Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur J Immunol*. 29(5):1543-50.
204. Takamatsu HH, Denyer MS, Wileman TE. 2002. A sub-population of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 87(3-4):223-4.

Literaturverzeichnis

205. Takamatsu HH, Denyer MS, Stirling C, Cox S, Aggarwal N, Dash P, Wileman TE, Barnett PV. 2006. Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 112(1-2):49-61.
206. Tam MA, Rydström A, Sundquist M, Wick MJ. 2008. Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol Rev.* 225:140-62.
207. Tauchi Y, Matsuzaki G, Takimoto H, Yoshikai Y, Nomoto K. 1992. A new subpopulation of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing high level of T cell receptor gamma delta. *Eur J Immunol.* 22(9):2465-8.
208. Teng, Q., Zhou, J., Wu, J., Guo, J., Shen, H. 2006. Characterization of chicken interleukin 2 receptor α chain, a homolog to mammalian CD25. *FEBS Lett.* 580, 4274–4281.
209. Theis, G., McBride, R., Schierman, L., 1975, Depression of in vitro responsiveness to phytohemagglutinin in spleen cells cultured from chickens with Marek's disease. *J Immunol* 115, 848-853.
210. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournié JJ, Scotet E, Bonneville M. 2007. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev.* 215:123-35.
211. Thielke KH, Hoffmann-Moujahid A, Weisser C, Waldkirch E, Pabst R, Holtmeier W, Rothkötter HJ. 2003. Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood. *Eur J Immunol.* 33(6):1649-56.
212. Tippenhauer M, Heller DE, Weigend S, Rautenschlein S. 2012. The host genotype influences infectious bursal disease virus pathogenesis in chickens by modulation of T cells responses and cytokine gene expression. *Dev Comp Immunol.* 40(1):1-10.
213. Toka FN, Kenney MA, Golde WT., 2011. Rapid and transient activation of $\gamma\delta$ T cells to IFN- γ production, NK cell-like killing, and antigen processing during acute virus infection. *J Immunol.* 186(8):4853-61.
214. Traxlmayr MW, Wesch D, Dohnal AM, Funovics P, Fischer MB, Kabelitz D, Felzmann T. 2010. Immune suppression by gammadelta T-cells as a potential regulatory mechanism after cancer vaccination with IL-12 secreting dendritic cells. *J Immunother.* 33(1):40-52.
215. Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E, Chen CL, Ratcliffe MJ, Davison TF, Young JR. 1995. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol.* 154(9):4485-94.
216. Turchinovich G, Pennington DJ. 2011. T cell receptor signalling in $\gamma\delta$ cell development: strength isn't

- everything. *Trends Immunol.* 32(12):567-73.
217. Väisänen J, Jensen P. 2004. Responses of young red jungle fowl (*Gallus gallus*) and White Leghorn layers to familiar and unfamiliar social stimuli. *Poult Sci.* 83.
218. Väisänen J, Håkansson J, Jensen P. 2005. Social interactions in Red Junglefowl (*Gallus gallus*) and White Leghorn layers in stable groups and after re-grouping. *Br Poult Sci.* 46(2):156-68.
219. Valbon SF, Condotta SA, Richer MJ. 2016. Regulation of effector and memory CD8(+) T cell function by inflammatory cytokines. *Cytokine.* 82:16-23.
220. van Hemert S, Hoekman AJ, Smits MA, Rebel JM, 2007. Immunological and gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine. *Vet Res.* 38(1):51-63.
221. Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. 2005. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect.* 133(6):959-78.
222. Vantourout P, Hayday A. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 13(2):88-100.
223. Vermijlen D1, Ellis P, Langford C, Klein A, Engel R, Willimann K, Jomaa H, Hayday AC, Eberl M. 2007. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J Immunol.* 178(7):4304-14.
224. Vrieling M, Santema W, Van Rhijn I, Rutten V, Koets A. 2012. $\gamma\delta$ T cell homing to skin and migration to skin-draining lymph nodes is CCR7 independent. *J Immunol.* 15;188(2):578-84.
225. Walker LJ, Marrinan E, Muenchhoff M, Ferguson J, Klooverpris H, Cheroutre H, Barnes E, Goulder P, Klenerman P. 2013. CD8 $\alpha\alpha$ Expression Marks Terminally Differentiated Human CD8+ T Cells Expanded in Chronic Viral Infection. *Front Immunol.* 4:223.
226. Walliser I, Göbel TW. 2018. Chicken IL-17A is expressed in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell subsets and binds to a receptor present on macrophages, and T cells. *Dev Comp Immunol.* 81:44-53.
227. Wang H, Sarikonda G, Puan KJ, Tanaka Y, Feng J, Giner JL, Cao R, Mönkkönen J, Oldfield E, Morita CT. 2011. Indirect stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells through alterations in isoprenoid metabolism. *J Immunol.* 15;187(10):5099-113.
228. Waters WR, Rahner TE, Palmer MV, Cheng D, Nonnecke BJ, Whipple DL. 2003. Expression of L-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells. *Infect Immun.* 71(1):317-26.
229. Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. 2011. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci.* 68(14):2357-70.
230. Wigley P. 2013. Immunity to bacterial infection in the chicken. *Dev Comp Immunol.* 41(3):413-7.

231. Wigley P. 2014. Salmonella enterica in the Chicken: How it has Helped Our Understanding of Immunology in a Non-Biomedical Model Species. *Front Immunol.* 5:482.
232. Wisner AL, Potter AA, Köster W. 2011. Effect of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system on Salmonella survival in activated chicken macrophage-like HD11 cells. *PLoS One.* 6(12):e29787.
233. Withanage GS, Wigley P, Kaiser P, Mastroeni P, Brooks H, Powers C, Beal R, Barrow P, Maskell D, McConnell I. 2005. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. *Infect Immun.* 73(8):5173-82.
234. Xie J, Zhang J, Wu H, Tang X, Liu J, Cheng G, Li P. 2017. The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice. *Saudi J Biol Sci.* 24(1):108-113.
235. Yu, Y., Wang, D., Abula, S., Hu, Y., Zhao, X., Huang, Y., Liu, J., Wu, Y., Wang, D., Tao, Y., Pan, H. 2013. The immunological adjuvant activity of gypenosides liposome against Newcastle disease vaccine. *Int J Biol Macromol* 60, 116– 121.
236. Yu, J., Shi, F., Hu, S. 2015. Improved immune responses to a bivalent vaccine of Newcastle disease and avian influenza in chickens by ginseng stem-leaf saponins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 167, 147– 155.
237. Zarin P, Chen EL, In TS, Anderson MK, Zúñiga-Pflücker JC. 2015. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cell Immunol.* 296(1):70-5.
238. Zekarias B, Ter Huurne AA, Landman WJ, Rebel JM, Pol JM, Gruys E. 2002. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet Res.* 33(2):109-25.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Stellung der $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb des Immunsystems

Abbildung 2: Übersicht über die untersuchten Hühnerlinien

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus des Transwell-Assays

Abbildung 4: Gating Strategie der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen

Abbildung 5: Prozentualer Anteil CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit PMA, IL-2, oder PMA + IL-2

Abbildung 6: CD25 Expression gemessen an der MFI jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit PMA, IL-2, oder PMA + IL-2

Abbildung 7: Prozentualer Anteil proliferierender Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit PMA, IL-2, oder PMA + IL-2

Abbildung 8: Prozentualer Anteil CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit ConA, PHA, ConA + IL-2, oder PHA + IL-2

Abbildung 9: CD25-Expression gemessen an der MFI jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit ConA, PHA, ConA + IL-2, oder PHA + IL-2

Abbildung 10: Prozentualer Anteil proliferierter Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation nach Stimulation mit

Abbildung 11: Veränderungen der absoluten Zellzahlen im peripheren Blut von Hühnern

Abbildung 12: Veränderungen der Expressionsintensitäten verschiedener Antigene auf der Oberfläche von CD8 α ^{hi+} $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes

Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse und Gating der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen

Abbildung 14: Fluoreszenzstärke der Oberflächenmarker TCR1 und CD8 α auf $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen

Abbildung 15: Anteil proliferierter $\gamma\delta$ -T-Zellen von jungen Küken zwischen Lebenstag 15 und 22

Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen

Abbildung 17: Anteil proliferierter $\gamma\delta$ -T-Zellen von Legehennen am Lebenstag 253

Abbildung 18: IFN- γ mRNA Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen immunisierter vs. unbehandelter Legehennen

Abbildung 19: Prozentualer Anteil CD25⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen IL-2 \pm SE-stimulierter Kultur

Abbildung 20: CD25-Expressionsintensität der TCR1^{hi+}CD8 α ^{lo+}, TCR1⁺CD8 α ^{hi+} und TCR1^{hi+}CD8 α ^{hi+} Zellen

Abbildung 21: Prozentualer Anteil MHC-II⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen IL-2 \pm SE-stimulierter Kultur

Tabellenverzeichnis

Abbildung 22: Prozentualer Anteil CD44⁺ Zellen in jeder $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulation nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen IL-2 \pm SE-stimulierter Kultur

Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der drei Zelloberflächenproteine CD25, MHC-II und CD44 im Vergleich zur Proliferation nach 5 Tagen SE-stimulierter Kultur der PBLs

Abbildung 24: Expressionsintensitäten (MFI) von CD8 α (a) und TCR1 (b) auf TCR1^{hi}CD8 α ^{lo}, TCR1⁺CD8 α ^{hi} und TCR1^{hi}CD8 α ^{hi} Zellen

Abbildung 25: Prozentualer Anteil migrierter $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach 4 h Inkubation

Abbildung 26: mRNA Transcriptionslevel ausgewählter Zytokine in den jeweiligen $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach 1, 3 und 5 Tagen SE-stimulierter Kultur

Abbildung 27: Zusammenfassende Darstellung der hypothetischen Funktionen der einzelnen aviären $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen in Antwort auf Salmonella Enteritidis

Abbildung 28: Kontrollen und Gating Schema der FACS Analysen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Monoklonale anti-Huhn Antikörper aus der Maus

Tabelle 2: Weitere, bisher nicht veröffentlichte Primer

Tabelle 3: Übersicht über den Versuchsaufbau und die Probennahme des Tierversuchs

Tabelle 4: Verwendete Stimulanzien zur Kultur von primären aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen

Tabelle 5: Zusammensetzung des qRT-PCR Ansatzes

Tabelle 6: qRT-PCR Programm

Tabelle 7: Proliferationsparameter der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen nach 72 h unter dem Einfluss von Salmonellen

Tabelle 8: Fold Changes der mRNA Transcriptionslevel im Verhältnis zur IL-2 Kontrolle nach 1, 3 und 5 Tagen nach Stimulation

Tabelle 9: Anzahl der im Experiment verwendeten Hühner für jede getestete Stimulation und die jeweiligen Messzeitpunkte

Tabelle 10: Anzahl der Proben für jede getestete Stimulation und die jeweiligen Messzeitpunkte

Anhang

Tab. 9: Anzahl der im Experiment verwendeten Hühner für jede getestete Stimulation und die jeweiligen Messzeitpunkte.

Stimulation	Zeitpunkt der Messung	Anzahl der Tiere
Unstimulierte Kontrolle	24 h; 48 h	10 WLA*, 11 BLA*, 12 R11*, 11 L68*
	72 h; 96 h	6 WLA, 8 BLA, 9 R11*, 8 L68
PMA; PMA + IL-2	24 h; 48 h	8 pro Linie (WLA, BLA, R11, L68)
	72 h; 96 h	3 WLA, 4 BLA, 4 R11, 4 L68
IL-2	24 h; 48 h; 72 h; 96 h	6 pro Linie (WLA, BLA, R11, L68)
ConA; ConA + IL-2; PHA; PHA + IL-2	24 h; 48 h; 72 h; 96 h	4 pro Linie (WLA, BLA, R11, L68)
IL-12	24 h; 48 h; 96 h	3 WLA
IL-15	72 h; 96 h	4 WLA
PMA + Ionomycin	4 h; 24 h; 48 h	8 pro Linie (WLA, BLA, R11, L68)

* wiederholte Messung der gleichen Tiere

Anhang

Tab. 10: Anzahl der Proben für jede Versuchsgruppe, Stimulation und Messzeitpunkte. Die aus dem Blut isolierten Lymphozyten wurden für *ex-vivo* (Re)-Stimulationsversuche mit SEvac verwendet. Daten der Proben von Lebenstag 14 bis 22 wurden bei der Auswertung jeweils zusammengefasst, da die Anzahl der Tiere pro Blutentnahmezeitpunkt zu gering war.

Alter	Versuchs- gruppe	PBL Stimulation mit:	Kulturzeit [h]	Anzahl der untersuchten Hühner pro Linie	
14 Tage - 22 Tage	Kontrolle		24	6 WLA, 6 BLA, 6 R11, 6 L68	
			IL-2	48	9 WLA, 9 BLA, 9 R11, 7 L68
				96	7 WLA, 9 BLA, 6 R11, 7 L68
		IL-2 + SEvac	24	6 WLA, 6 BLA, 6 R11, 5 L68	
			48	6 WLA, 6 BLA, 6 R11, 4 L68	
			96	6 WLA, 6 BLA, 5 R11, 4 L68	
	Immunisiert		24	5 WLA, 5 BLA, 6 R11, 6 L68	
			IL-2	48	7 WLA, 5 BLA, 7 R11, 7 L68
				96	6 WLA, 5 BLA, 7 R11, 6 L68
		IL-2 + SEvac	24	5 WLA, 5 BLA, 5 R11, 6 L68	
48, 96			7 WLA, 5 BLA, 7 R11, 6 L68		
24 Tage	Kontrolle	IL-2, IL-2 + SEvac	24, 48, 96	3 WLA, 2 BLA, 3 R11, 3 L68	
25 Tage	Immunisiert Erster Booster	IL-2, IL-2 + SEvac	24, 48, 96	2 WLA, 2 BLA, 3 R11, 3 L68	
	Kontrolle	IL-2, IL-2 + SEvac	24, 48, 72	4 WLA, 4 BLA, 4 R11, 4 L68	
246 Tage	Immunisiert Erster und zweiter Booster	IL-2, IL-2 + SEvac	24, 48, 72	4 WLA, 4 BLA, 4 R11, 4 L68	

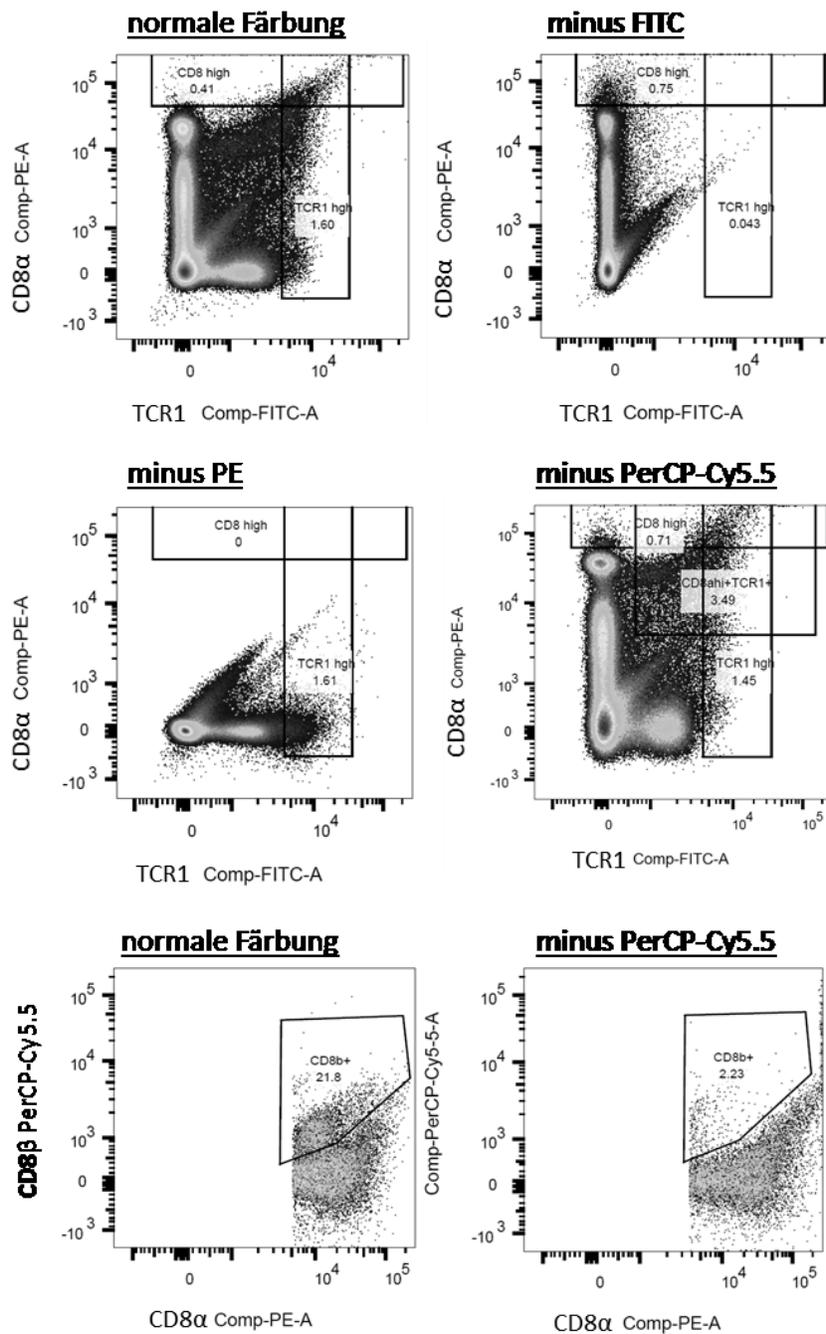


Abb. 28: Kontrollen und Gating Schema der FACS Färbungen. Zur Kontrolle der Richtigkeit der Färbung und des Gatings wurden „Fluorescence minus one“ – FMO Kontrollen angefertigt. Dabei wird jeweils ein Antikörper im Vergleich zur normalen Färbung weggelassen. Die oberen 4 Bilder zeigen das Gating nach TCR1 und CD8α und die unteren beiden Bilder die weitere Aufteilung der CD8α⁺TCR1⁺ Zellen nach ihrer CD8α- oder CD8αβ-Expression.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Ich habe die Dissertation selbständig angefertigt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen wurden in der Arbeit angegeben. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts hat mich Dr. Angela Berndt (FLI, Jena) unterstützt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Außerdem wurde die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung auch nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Lübeck, den 20.06.2021

Christina Polesky

Danksagung

Mein erster Dank gilt Dr. Angela Berndt und Dr. Christian Menge für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmittel am Friedrich-Loeffler-Institut in Jena. Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Ilse Jabcobsen (Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, FSU Jena) für die hilfreichen Hinweise, Diskussionen und die Begutachtung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Angela Berndt für die intensive Betreuung und stetige Unterstützung sowie die zahlreichen Diskussionen bei der Bearbeitung meines Promotionsthemas. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am FLI in Jena bedanken, die mich während meiner Arbeiten unterstützt haben und zum Gelingen der Experimente beigetragen haben. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Katrin Schlehahn für die gute Zusammenarbeit im Labor und ihre ständige Unterstützung und Expertise in labortechnischen Fragen. Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter des Tierhauses, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke auch an Dr. Ulrich Methner und seine Mitarbeiterinnen für die Versorgung mit Salmonellen und das Mitwirken am Tierversuch. Des Weiteren herzlichen Dank an meine lieben Kolleginnen Dr. Maria Braukmann, Dr. Annette Prohl, Dr. Kirstin Hilarius, und Lisa Wirker für die Hilfe, Diskussionen und insgesamt schöne Zeit während meiner Doktorandenzeit.

Mein größter Dank gilt meiner Mama, die mich die ganze Zeit unterstützt hat und mir immer das Gefühl vermittelt hat, dass ich alles schaffen kann.

Christina Polasky, M.Sc.

Name: Christina Polasky
Anschrift: Vorrader Str. 2, 23560 Lübeck
Geburtstag und -ort: 15.09.1989 in Erfurt
Nationalität: deutsch
E-Mail: christina.polasky@web.de

Wissenschaftlicher Werdegang

seit 11/2017 Wissenschaftliche Angestellte am UK-SH, Campus Lübeck
Klinik für HNO-Heilkunde
Schwerpunkt Tumorbilogie/Immuntherapie von Hals-Kopf-Tumoren
11/ 2013 - 10/ 2016 Doktorandin am Friedrich-Loeffler-Institut, Jena;
Thema: „Aktivierung und Funktionen CD8 α -charakterisierter $\gamma\delta$ -T-
Zellsubpopulationen bei verschiedenen Hühnerlinien“
10/ 2012 - 10/ 2013 Masterarbeit am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena; Thema: “The
influence of autophagy inhibition on EGFR-TKI resistant lung cancer cell lines“

Akademische und schulische Ausbildung

10/ 2011 - 10/ 2013 M. Sc. in Molecular Life Science an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Gesamtnote: 1,4
10/ 2008 - 09/ 2011 B. Sc. in Biologie mit Vertiefungsrichtung Molecular Life Science an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
06/ 2008 Allgemeine Hochschulreife; Heinrich-Hertz Gymnasium in Erfurt

Studienbegleitende Nebentätigkeiten:

10/ 2012 - 12/ 2012 Studentische Hilfskraft im Histologie-Kurs für Mediziner am Institut für
Pathologie
05/ 2012 - 08/ 2012 wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Genetik, FSU Jena

Lebenslauf

Publikationen:

Polasky, C., Weigend, S., Schrader, L., Berndt, A., 2016. Non-specific activation of CD8 α -characterised $\gamma\delta$ T cells in PBL cultures of different chicken lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 179:1-7

Polasky, C., Wallesch, M., Loyal, K., Pries, R., Wollenberg, B., 2020. Measurement of leukocyte-platelet aggregates (LPA): a comparative analysis. *Platelets.* 26:1-6. doi: 10.1080/09537104.2020.1732900.

Polasky, C., Wendt, F., Pries, R., Wollenberg, B., 2020. Platelet induced functional alteration of CD4+ and CD8+ T cells in HNSCC. *Int. J. Mol. Sci.* 21(20), 7507; <https://doi.org/10.3390/ijms21207507>.

Polasky, C., Steffen, A., Loyal, K., Lange, C., Bruchhage, K-L., Pries, R. Redistribution of monocyte subsets in OSAS patients leads to imbalanced PD-1/PD-L1 crosstalk with CD4/CD8 T-cells. (*Accepted; J Immunol*).

Idel, C., Ribbat-Idel, J., Klapper, L., Bruchhage, K-L., Krupar, R., Dreyer, E., Polasky, C., Wollenberg, B., Perner, S. Spatial distribution of immune cells in HNSCC. (*submitted; Cancer*).