

Aus dem Max – Delbrück – Zentrum für
Molekulare Medizin Berlin – Buch

DISSERTATION

**Gewebsspezifische Rekrutierung und Funktionalität von
 $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und entzündlichen
Bedingungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Peter
aus Bernau bei Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1 Komponenten des Immunsystems	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 T-Zell-vermittelte Immunität	2
1.1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen	5
1.2 Mechanismen und Komponenten der Zellmigration	7
1.2.1 Das Vier-Stufen-Modell der Lymphozytenmigration	7
1.2.2 Klassifikation und Funktion des Chemokin-Chemokinrezeptorsystems	8
1.2.3 Adhäsionsmoleküle und Integrine-Integrinliganden	9
1.3 Die Peritonealhöhle als immunologisches Organ	10
1.4 Das mukosale Immunsystem des Darms	12
1.4.1 Generelle Mechanismen der mukosalen Immunantworten im Darm	12
1.4.2 IL-17-vermittelte Immunität	15
1.4.3 Charakterisierung der akuten Kolitis	16
1.4.4 Kolitis-Tiermodelle	17
1.5 Einteilung, Symptomatik und Therapie der Kolitis beim Menschen	18
1.6 Aufgabenstellung	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material	21
2.1.1 Puffer und Medien	21
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Antikörper und Streptavidin-Konjugate	22
2.1.4 Rekombinante Proteine	23
2.1.5 Kits	24
2.1.6 Mäuse	24
2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.8 Software	27

2.2	METHODEN	27
2.2.1	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Isolierung von primären mononukleären Zellen	27
2.2.1.1.1	Erythrozyten-Lyse	27
2.2.1.1.2	Isolierung von mononukleären Zellen aus Milz und Thymus	27
2.2.1.1.3	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Peritoneum	28
2.2.1.1.4	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	28
2.2.1.1.5	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Kolon	28
2.2.1.1.6	Anreicherung von T-Zellen mittels MACS	29
2.2.1.2	Durchflusszytometrie	30
2.2.1.3	Detektion von intrazellulären INF γ und IL-17	30
2.2.1.4	Migrationsassays	31
2.2.1.5	Zellsortierung	31
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2.1	Isolierung von RNA aus peritonealen und splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen	32
2.2.2.2	Überprüfung der RNA-Qualität	32
2.2.2.3	Reverse Transkription zur Herstellung komplementärer DNA	33
2.2.2.4	qPCR <i>Arrays</i>	33
2.2.3	Tierexperimentelle Arbeiten	33
2.2.3.1	DSS-induzierte Kolitis	33
2.2.3.2	Adoptiver und kompetitiver Zelltransfer	33
2.2.3.2.1	Transferexperimente	33
2.2.3.2.2	Kompetitiver Transfer	34
2.2.4	Statistik	34
3.	ERGEBNISTEIL	36
3.1	Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellsubtypen in Milz, Peritoneum und Kolon unter homöostatischen Bedingungen	36
3.2	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum	37
3.2.1	Homöostatisches Chemokinrezeptorprofil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen	37
3.2.1.1	Exemplarische <i>Gating</i> strategie von $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz und Peritoneum	37
3.2.1.2	Rolle von CCR6 als funktioneller Marker und <i>Homing</i> rezeptor für $\gamma\delta$ T-Zellen	37
3.2.1.3	Rolle von CCR9 als mukosaler <i>Homing</i> rezeptor	39
3.2.1.4	CCL28-vermittelte Chemotaxis peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen	40

3.2.2	Expressionslevel von Integrinen und Adhäsionsmolekülen auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen	42
3.2.3	Reifungs- und Aktivierungsstatus peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen	45
3.2.4	Zytokinprofil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen	46
3.2.4.1	Expression von IL-17	46
3.2.4.2	ROR γ t abhängige Differenzierung von IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen	48
3.2.5	Unterschiede IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz, Peritoneum und Kolon	50
3.2.5.1	CD8 α als T-Zell-Korezeptor	50
3.2.5.2	CD27 als Oberflächenmarker	52
3.2.6	Molekulare Signatur splenozytärer und peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen	54
3.2.6.1	RNA-Isolation aus $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz und Peritoneum	54
3.2.6.2	Unterschiede der Genexpressionslevel von splenozytären und peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen	55
3.3	Das peritoneale Mikromilieu hat Einfluss auf die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von $\gamma\delta$ T-Zellen	59
3.3.1	Immunologische Plastizität in der Peripherie	59
3.3.2	Splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen erwerben einen peritonealen Phänotyp nach intraperitonealem <i>Priming</i>	59
3.4	Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen unterstützen lokal Immunantworten im entzündeten Kolon	61
3.4.1	Adoptiver Zelltransfer von Splenozyten und <i>Homing</i> in das entzündete Kolon	61
3.4.2	Chemokinrezeptorabhängiges Migrationsverhalten von $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon	65
3.4.3	Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon in Abhängigkeit von der Applikationsroute	67
4.	DISKUSSION	70
4.1	Die peritoneale Mikroumgebung beeinflusst $\gamma\delta$ T-Zellfunktionen	70
4.1.1	Einfluss auf die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Migrationsverhalten	70
4.1.2	Potentielle Mechanismen des peritonealen „ <i>Imprintings</i> “	75
4.1.3	$\gamma\delta$ T-Zell-Effektorfunktionen - zwischen intrathymischer Programmierung und funktioneller Plastizität in der Peripherie	78
4.2	Das Peritoneum unterstützt Darm-assoziierte Immunantworten während einer akuten Kolitis	81
4.2.1	Gerichtete Migration peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon	81
4.2.2	Rolle von $\gamma\delta$ T-Zellen bei einer akuten Kolitis-Immunregulatoren oder Entzündungsmediatoren?	85

5.	LITERATURVERZEICHNIS	88
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
7.	TABELLENVERZEICHNIS	102
8.	LEBENS LAUF	103
9.	DANKSAGUNG	104
10.	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	105

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufrechterhaltung der mukosalen Immunität wird durch eine koordinierte Rezirkulation und gerichtete Rekrutierung von Lymphozyten in das intestinale Gewebe gewährleistet. $\gamma\delta$ T-Zellen, eine kleine Lymphozyten-Subpopulation, wurden bereits als wichtige Immunregulatoren während einer intestinalen Entzündung identifiziert. Der gerichtete Migrationsprozess der $\gamma\delta$ T-Zellen in das akut entzündete Kolon wird dabei durch die Expression gewebsspezifischer Adhäsionsmoleküle und Integrine sowie einer bestimmten Kombination von *Homing*-Rezeptoren unterstützt. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden unter Verwendung des Mausmodells der DSS-induzierten Kolitis drei Schwerpunkte fokussiert: Im ersten Teil wurden $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Phänotyps charakterisiert. Im zweiten Schritt wurden die Modulationsfähigkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen und die Relevanz des Peritoneums bei *Imprinting*vorgängen peripher zirkulierender $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. Abschließend wurden das Migrationsverhalten peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in den Darm und deren potentieller Einfluss auf eine akute Entzündung im Kolon analysiert.

Zunächst wurden die phänotypischen und funktionellen Merkmale von $\gamma\delta$ T-Zellen in den verschiedenen Organen Milz, Peritoneum und Kolon unter homöostatischen Bedingungen untersucht und mit denen während einer akuten Kolitis verglichen. Ein Anteil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert die charakteristischen *Homing*faktoren CCR6, LFA-1, CD44, $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$, welche mit Migration in das Kolon assoziiert sind. Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten weiterhin einen reiferen und aktivierten Phänotyp als ihr splenozytären Pendant. In *in vitro* Stimulationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Anteil IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum signifikant höher war als in der Milz. $\gamma\delta$ T-Zellen und die IL-17-produzierende Subpopulation in Peritoneum und Kolon wurden näher definiert: Peritoneale IL17⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen waren negativ für CD27 und CD8 α , die IL17⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen positiv für die Expression von CD27, wobei CD27 als einzigartiger Differenzierungsmarker zwischen IL17⁺ und IL17⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen der Bauchhöhle identifiziert wurde. Im Kolon exprimierten sowohl $\gamma\delta$ T-Zellen der Lamina Propria und des intraepithelialen Kompartiments CD8 α . Die IL-17 Produzenten waren in beiden Kompartimenten negativ für CD8 α .

Um zu untersuchen, ob die peritoneale Mikroumgebung die funktionelle Stabilität und Plastizität peripher zirkulierender $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflusst, wurden peritoneale und splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen auch auf transkriptioneller Ebene näher charakterisiert. Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten im

Unterschied zu splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen höhere Expressionslevel charakteristischer Transkriptionsfaktoren für die T_H17 -Zelldifferenzierung.

Interessanterweise zeigte der adoptive Transfer von Wt-Splenozyten in die peritoneale Mikroumgebung, dass splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen ihr *Homing*-Rezeptor-Muster ändern und an das der Peritonealhöhle adaptieren können. Anhand der durchgeführten Transferexperimente wurde hiermit erstmals die elementare Bedeutung des Peritoneums beim *Imprinting* peripher zirkulierender $\gamma\delta$ T-Zellen hervorgehoben.

Adoptive Transferexperimente von Wt-Splenozyten in die peritoneale Mikroumgebung bewiesen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen von der Peritonealhöhle in die Lamina Propria und das intraepitheliale Kompartiment des entzündeten Kolons migrieren können. Die Rekrutierung von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peritoneum in das entzündete Kolon war ähnlich effektiv wie das *Homing* von $\gamma\delta$ T-Zellen über den venösen Weg.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass gewebsspezifische Faktoren des Peritoneums einen Einfluss auf die Funktionalität, den Phänotyp und die Migrations- und Differenzierungskapazität von $\gamma\delta$ T-Zellen haben. Die gerichtete Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in das akut entzündete Kolon könnte dabei durch *Imprinting*mechanismen in der peritonealen Mikroumgebung unterstützt werden.

SUMMARY

The coordinated recirculation and directed recruitment of lymphocytes to intestinal tissue is a prerequisite to maintain mucosal immunity. $\gamma\delta$ T-cells, a small subset of lymphocytes, have already been identified as important immunoregulators during intestinal inflammation. A coordinated migration of $\gamma\delta$ T-cells to the inflamed large intestine is supported by the expression of tissue-specific adhesion molecules and integrins as well as a selective combination of *homing* receptors.

The aim of this thesis was to analyze whether regulated migration represents a prerequisite for local differentiation and function of $\gamma\delta$ T-cells under homeostatic conditions as well as during intestinal inflammation. First, function and phenotype of $\gamma\delta$ T-cells from peritoneal cavity were characterized under homeostatic and inflammatory conditions. Secondly, it was investigated if the peritoneal microenvironment modulates $\gamma\delta$ T-cell function and plasticity and whether this peritoneal *imprinting* alters the recirculation behavior of $\gamma\delta$ T-cells. Finally, the kinetics of peritoneal $\gamma\delta$ T-cell migration into the gut under homeostatic conditions as well as during an acute DSS-induced colitis were studied.

Phenotypic and functional aspects of $\gamma\delta$ T-cells in the different organs spleen, peritoneal cavity and large intestine were analyzed and then compared with those during an acute colitis. A proportion of $\gamma\delta$ T-cells expressed the characteristic *homing* factors CCR6, LFA-1, CD44, $\alpha 4\beta 7$ and $\alpha 4\beta 1$ which are associated with migration into the large intestine. Peritoneal $\gamma\delta$ T-cells displayed a more activated and mature phenotype than splenic $\gamma\delta$ T-cells. It could be shown, that the frequency of IL-17 producing $\gamma\delta$ T-cells in the peritoneal cavity was significantly higher than in the spleen. $\gamma\delta$ T-cells and the IL-17 producing subpopulation have been further characterized: Peritoneal $\gamma\delta$ T-cells are CD27⁺ and CD8 α ⁻, the IL-17 producing subpopulation is CD27 negative. CD27 could be identified as a unique differentiation marker between IL17⁺ and IL17⁻ $\gamma\delta$ T-cells in peritoneal cavity. In the large intestine, $\gamma\delta$ T-cells of the lamina propria and the intraepithelial compartment express CD8 α . IL-17 producing $\gamma\delta$ T-cells in both compartments were negative for CD8 α .

Additionally, transcription factor gene expression levels of peritoneal in comparison to splenic $\gamma\delta$ T-cells were analyzed. Peritoneal $\gamma\delta$ T-cells revealed an increased expression of characteristic transcription factors regulating the differentiation of T_H17 cells.

Interestingly, when injected intraperitoneally, Wt splenic $\gamma\delta$ T-cells acquired the *homing* receptor pattern of peritoneal $\gamma\delta$ T-cells and profoundly changed their phenotype. Based on these transfer

experiments, for the first time, the functional plasticity of peripherally circulating $\gamma\delta$ T-cells and the relevance of the peritoneal cavity during *imprinting* processes could be demonstrated.

Splenic $\gamma\delta$ T-cells adoptively transferred into the peritoneal cavity could be recovered in the lamina propria and the intraepithelial compartment of the non- or inflamed colon showing for the first time that $\gamma\delta$ T-cells migrate from the peritoneal cavity into the mucosal tissue of the gut. Comparative transfer experiments confirmed that recruitment of $\gamma\delta$ T-cells from the peritoneal cavity is similarly effective to *homing* of $\gamma\delta$ T-cells from the venous way.

In summary, tissue-specific cues of the peritoneal cavity affect functionality, phenotype, migratory and differentiation capacity of $\gamma\delta$ T-cells. The directed migration of $\gamma\delta$ T-cells to the acute inflamed large intestine is supported by *imprinting* mechanisms in the peritoneal environment.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCL, CCR	CC-Chemokinligand,-rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CU	Colitis ulcerosa
CXCL, CXCR	CC-Chemokinligand,-rezeptor
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat (<i>Dextran-Sodium-Sulfat</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA-3	<i>trans-acting T-cell-specific transcription factor-3</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
$\gamma\delta$ T17	IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen
$\gamma\delta$ INF γ	INF γ -produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen
HEV	hoch-endotheliale Venole
high	hoch exprimiert
HLA	humanes Leukozyten-Antigensystem

ICAM	<i>intracellular-adhesion-molecule</i>
ICOS	<i>inducible T-cell co-stimulator</i>
Id2	<i>inhibitor of DNA binding 2</i>
IEL	intraepitheliales Kompartiment
IELs	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILF	<i>isolated lymphoid follicle</i>
iNKT cells	invariante Natürlichen-Killler-Zellen
int	intermediär exprimiert
Irf-1	<i>interferon regulatory factor 1</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KGF	<i>kertinocyte-growth-factor</i>
LFA-1	<i>leukocyte function-associated antigen-1</i>
low	niedrig exprimiert
LP	Lamina Propria
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
LTi cells	<i>Lymphoid tissue inducer Zellen</i>
Mac1	<i>macrophage antigen-1</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal-addressin cell adhesion molecule-1</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MC	Morbus Crohn
MCP-1	<i>monocyte chemotactic factor</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mLN	mesenterialer Lymphknoten

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MUC2	<i>mucus gel-forming protein 2</i>
Myb	<i>myeloblastosis oncogene</i>
M-Zellen	<i>microfold cells</i>
n	Anzahl (<i>number</i>)
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NK1.1	<i>natural killer cell-associated marker NK1.1</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NOD	<i>NOD non-obese diabetic</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD1	<i>programmed cell death protein 1</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PDCA-1	<i>plasmacytoid dendritic cell antigen-1</i>
PE	R-Phycoerythrin
PerC	Peritoneum (<i>peritoneal cavity</i>)
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNAd	<i>peripheral lymph node addressin</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PTX	Pertussistoxin
RAG	<i>recombination activating gene</i>
REG3 γ	<i>regenerating protein 3γ</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROR γ ,a,c	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor γ,a,c</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RUNX1	<i>runt-related transcription factor</i>
Scid	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDF-1 α	<i>stromal-derived factor-1α</i>
SLO	sekundär lymphatische Organe
SNARF-1	Semi-naphto-rhodafluor-1

SOCS	<i>suppressors of cytokine signaling protein</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and acitvator of transcription</i>
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
T _{FH}	follikuläre T-Helferzellen
TGF	<i>transforming-growth factor</i>
T _H 1/T _H 2/T _H 17	T-Helferzellen Typ1/Typ2/Typ17
Thy	Thymus
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	<i>vascular-cellular-adhesion-molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
Wt	Wildtyp

1. EINLEITUNG

1.1 Komponenten des Immunsystems

1.1.1 Überblick

Täglich wird unser Immunsystem mit diversen extrazellulären und intrazellulären Pathogenen wie Mikroben oder virusinfizierten Zellen konfrontiert. Um die Herausforderung zu meistern, den physiologischen Gleichgewichtszustand im Körper aufrechtzuerhalten, kam es im Zuge der Evolution zur Differenzierung in ein angeborenes (unspezifisches) und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem.

Die angeborene Immunität ist verantwortlich für die initiale Verteidigung des Organismus vor Infektionen, sie ist aber nicht in der Lage, Antigen-spezifisch Pathogene zu erkennen und vor Reinfektion zu schützen [1, 2]. Neben mechanischen Barrieren (Epithelschicht der Haut, respiratorisches Flimmerepithel des Bronchialsystems und Muzinen im Gastrointestinaltrakt) sind zelluläre Vertreter wie neutrophile Granulozyten, Natürliche-Killer-Zellen, Eosinophile und Makrophagen Teil des angeborenen Immunsystems. Außerdem haben humorale Faktoren wie Zytokine, Opsonine, Komplementfaktoren oder antimikrobielle Stoffe zentrale Bedeutung bei der Abwehr von Krankheitserregern. Hauptmechanismus der angeborenen Immunität ist die Phagozytose, die Erkennung und Internalisierung von Fremdkörpern und anschließende Präsentation von Antigenen an Zellen des adaptiven Immunsystems [3]. Dieses entwickelt sich langsam von Geburt an und nimmt im Laufe des Lebens an Effektivität zu. In den Keimzentren der Lymphknoten differenzieren und proliferieren Antigen-spezifische Lymphozyten in Effektorzellen, die im Vergleich zum angeborenen Immunsystem über das immunologische Gedächtnis eine schnellere und stärkere Immunantwort ausüben [4].

Zentrale Eigenschaften der erworbenen Immunität sind Spezifität, Diversität, Gedächtnisfunktion, klonale Expansion und Autotoleranz [1]. Das erworbene Immunsystem benutzt zellvermittelte und humorale Strategien zur Immunabwehr. Teil der humoralen Abwehr sind B-Lymphozyten, die sich in Plasmazellen differenzieren und lösliche Antikörper (Immunglobuline, Ig) sezernieren, welche ein Antigen spezifisch binden und eliminieren können. Die zellvermittelte Immunabwehr übernehmen T-Lymphozyten, welche in die beiden großen Fraktionen der zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) und der T-Helferzellen (T_H-Zellen) eingeteilt werden. Weiteren Bestandteil bilden die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen oder

Langerhans-Zellen der Epidermis der Haut. Diese nehmen Antigen aus der Umgebung auf und präsentieren es patrouillierenden Lymphozyten. Das System der angeborenen Immunität kann nicht streng von der erworbenen separiert werden, denn für die Generierung einer effektiven Immunantwort ist eine Interaktion aller Komponenten erforderlich.

Die Immunzellen zirkulieren kontinuierlich zwischen Geweben im Körper über den Blutstrom und das lymphatische System, insbesondere aber platzen sie sich in den lymphatischen Organen. Diese kann man in primäre (Thymus und Knochenmark) und sekundäre (Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe = MALT) lymphatische Organe einteilen. In den primären findet der Reifungs- und Differenzierungsprozess von Vorläuferzellen in immunkompetente, noch naive Lymphozyten statt. Zukünftige T-Zellen differenzieren im Thymus, B-Zellen im Knochenmark. Diese werden in die Peripherie entlassen und besiedeln sekundär lymphatische Organe (SLO), in denen dann nach Antigenkontakt über die Proliferation und Entwicklung von Effektor- und Gedächtniszellen eine spezifische Immunantwort initiiert wird.

1.1.2 T-Zell-vermittelte Immunität

Nach Abschluss ihrer Differenzierungsprozesse im Thymus können naive T-Zellen anhand des T-Zellrezeptors und der Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 in jeweils zwei Klassen eingeteilt werden. Der bei ca. 95 % aller T-Zellen, den konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen, exprimierte T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus einem $\alpha\beta$ -Heterodimer, welches den T-Zell-Rezeptor (TCR) bildet und die Antigen-spezifität definiert. Der TCR ist mit einem Komplex aus drei CD3-Proteinen und einer ζ -Kette assoziiert, welche für die Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich sind [5, 6]. Eine kleine Subpopulation von T-Zellen exprimiert einen alternierenden Rezeptor, der aus einer γ und einer δ -Kette besteht. Diese T-Zellen werden als $\gamma\delta$ T-Zellen bezeichnet. Antigen-spezifische T-Zellrezeptoren können das Fremdprotein nicht direkt erkennen, sondern es bedarf einer Bindung an körpereigene Oberflächenmoleküle, die als *major histocompatibility complex* (MHC) oder synonym auch *humanes Leukozyten-Antigensystem* (HLA) bezeichnet werden. CD8 tragenden $\alpha\beta$ T-Zellen wird Antigen von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen über MHC-Klasse I präsentiert. Sie differenzieren zu zytotoxischen T-Lymphozyten, welche über Sekretion von Perforinen, Granzymen oder Fas-Molekülen den programmierten Zelltod der Zielzelle, respektive Apoptose, induzieren [7]. Den CD4 tragenden $\alpha\beta$ T-Zellen wird Peptid nach Antigenprozessierung über MHC-Klasse II auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert. CD4⁺-Lymphozyten sind für die Aktivierung von B-Zellen, Monozyten/Makrophagen sowie anderen Immunzellen verantwortlich.

Über die Antigen-präsentierenden Zellen und regulatorischen Signale aus der Mikroumgebung der naiven $CD4^+$ T-Zelle kommt es über variable Zytokine und Oberflächenmoleküle zu ihrer Differenzierung in die fünf Effektorpopulationen T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_{FH} -Zellen und regulatorische T-Zellen (Abb.1). Die einzelnen Subtypen werden durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, Signaturzytokine, Effektorfunktionen und Oberflächenmarker spezifiziert [2, 8].

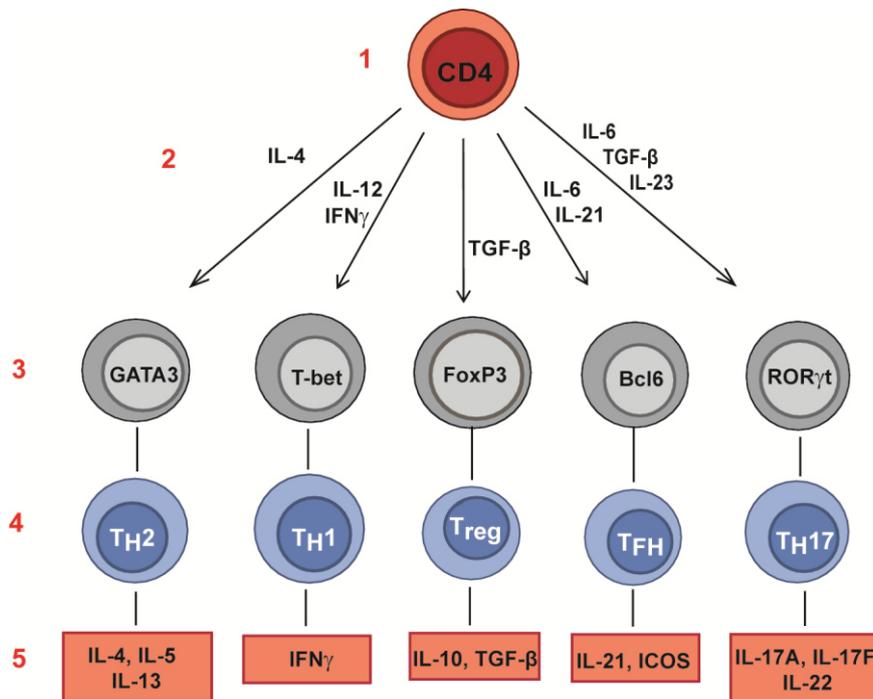


Abb. 1: Schematische Darstellung der $CD4$ -T-Zelldifferenzierung

Naive $CD4^+$ T-Zellen (1) werden durch Antigen-präsentierende Zellen über kostimulatorische Moleküle wie CD28 und/oder den *inducible T-cell co-stimulator* (ICOS) aktiviert. In Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu (2) und der Hochregulation bestimmter Mastertranskriptionsfaktoren, die spezifisch für die einzelnen T-Zell-Effektorpopulationen sind (3), differenzieren die naiven $CD4^+$ T-Zellen in die verschiedenen T_H -Effektorpopulationen T_H2 , T_H1 , Treg, T_{FH} und T_H17 (4). Jede T-Zelllinie ist zudem durch die Expression charakteristischer Signaturzytokine gekennzeichnet (5) (modifiziert nach [8, 9]).

T_H1 -Zellen fungieren als Hauptkomponente der Zell-vermittelten Immunität bei der effizienten Bekämpfung von intrazellulären Erregern. Die Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4 (*signal transducer and acitvator of transcription 4*) fördern ihre Differenzierung. Über ihr Schlüsselzytokin IFN_γ aktivieren sie Monozyten/Makrophagen und stimulieren B-Zellen zur Produktion von Antikörper-Isotypen, die ebenfalls die Phagozytose von Mikroben unterstützen. Weitere zelluläre Zielstrukturen der T_H1 -Zellen sind zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen, die nach Aktivierung beispielsweise virusinfizierte Zellen abtöten.

Die Differenzierung von T_H2 -Zellen wird vorwiegend über den Mastertranskriptionsfaktor GATA-3 (*trans-acting T-cell-specific transcription factor-3*) gesteuert. Sie aktivieren über Interleukin-5 (IL-5) Eosinophile, welche essentiell bei der Bekämpfung von Helminthen sind. Ihr Signaturzytokin IL-4 induziert die IgE-Produktion von B-Zellen und die anschließende Mastzelldegranulation im Rahmen allergischer und asthmatischer Pathogenesen [10]. T_H2 -Zellen fördern über IL-4 auch die Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen und übernehmen somit umfassende Helferfunktionen im Rahmen der Immunantwort.

IL-17 der T_H17 -Zellen bewirkt die Sekretion von Chemokinen und Interleukinen, welche zur Rekrutierung von Immunzellen, vorrangig Monozyten und neutrophile Granulozyten, zum Ort der Entzündung beitragen. Inzwischen wurden neben ROR γ t unter anderem auch ROR α , AHR (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) und RUNX1 (*runt-related transcription factor*) als Mastertranskriptionsfaktoren der T_H17 Differenzierung identifiziert [11-14]. Durch IL-22, dem zweiten Schlüsselzytokin der T_H17 -Zellen, werden antimikrobielle Peptide induziert und die Barrierefunktion von Epithelschichten aufrechterhalten [15, 16].

Als weitere Subklasse der $CD4^+$ T-Zellen gelten die folliculären T-Helferzellen (T_{FH} -Zellen). Diese lokalisieren präferiert in B-Zellreichen Lymphfollikeln und unterstützen die dortige B-Zell-Keimzentrums-Reaktion, die neben der Proliferation Antigen-stimulierter B-Zellen auch die Differenzierung dieser in Plasma- und Gedächtniszellen umfasst. Der Transkriptionsfaktor Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*) induziert die T_{FH} -Zell-Differenzierung. Charakteristische Oberflächenmarker von T_{FH} -Zellen sind der Chemokinrezeptor CXCR5, PD1 (*programmed cell death protein 1*) als T-Zellregulator und das kostimulatorische Molekül ICOS [17].

Regulatorische T-Zellen (Tregs) können über die Sekretion der beiden Hauptvertreter antiinflammatorischer Zytokine, IL-10 und *transforming-growth-factor* β (TGF- β) Immunantworten und Entzündungen supprimieren [18]. Die $CD4^+$ Tregs werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: die natürlich vorkommenden $CD4^+ CD25^+$ Tregs, die sich im Thymus direkt aus $CD4^+$ T-Zellen in Interaktion mit Thymusepithelzellen entwickeln und die zweite Population der induzierten Tregs. Diese entwickeln sich entweder aus naiven $CD4^+$ T-Zellen über Zell-Zell-Kontakte mit natürlich vorkommenden $CD4^+ CD25^+$ Tregs oder unter Einfluss antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- β oder IL-10 [19]. Der Mastertranskriptionsfaktor der Tregs ist FOXP3 (*forkhead box P3*) [20].

1.1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen stellen mit 1-5 % eine kleine Subpopulation der über den Blutstrom und die peripheren Organe zirkulierenden Lymphozyten dar. Sie treten insbesondere in epithelreichen Geweben wie der Mukosa des Gastrointestinaltrakts, des Reproduktionstrakts und in der Epidermis der Haut auf [21, 22]. Beim Menschen sind ca. 5-15 % der intraepithelialen Lymphozyten (IELs) im Dünndarm und etwa 40 % der IELs des Kolons $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen. In der Maus sind die $\gamma\delta$ T-Zellen mit annähernd 100 % der IELs in der Epidermis und Vagina sowie ca. 50 % der IELs des Dünndarms häufiger repräsentiert [23].

Im Gegensatz zu konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen konstituiert sich der T-Zell-Rezeptor (TCR) der $\gamma\delta$ T-Zellen aus einer γ sowie einer δ -Kette. Ihnen fehlt die Expression der Korezeptoren CD4 und CD8. Ähnlich der Entstehung von Antikörpern der B-Zellen und $\alpha\beta$ TCRs wird der $\gamma\delta$ TCR über die somatische Rekombination von V- (*variable*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Gensegmenten generiert. Die hohe strukturelle Diversität des $\gamma\delta$ TCR-Repertoires ist bedingt durch junktionale Diversifizierung, zufällige Kombination der V-, D- und J-Segmente und akzidentellem Entfernen oder Hinzufügen von Nukleinsäuren an Genelementen [21, 23]. Die funktionelle Differenzierung der $\gamma\delta$ T-Zellen ist ein dreistufiger Prozess. In der Mikroumgebung des Thymus findet der erste Schritt statt, aus dem bereits funktionell kompetente $\gamma\delta$ T-Zellen hervorgehen können. Die zweite Stufe umfasst die Weiterentwicklung von $\gamma\delta$ T-Zellen in SLO, die intrathymisch nur einen intermediären oder prä-aktivierten Zustand erreicht haben. Diese wird in den SLO vorrangig von aktivierten dendritischen Zellen induziert. In der Peripherie wird schließlich über die TCR-abhängige Selektion von Klonen der Differenzierungsprozess beendet [24].

Interessanterweise sind $\gamma\delta$ T-Zellen, da sie RAG-1 und RAG-2 exprimieren (*recombination activating gene*), Prozesse des T-Zell-Rezeptor-Gen-Rearrangements durchlaufen und pleiotrope Effektorfunktionen ausüben, per definitionem Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie verhalten sich jedoch eher wie Zellen der angeborenen Immunität, da sie die Initiierung einer Immunantwort unterstützen und werden deshalb neben B1-Zellen und invarianten Natürlichen-Killer-Zellen (*iNKT cells*) den *innate-like lymphocytes* zugeordnet [2, 25]. Als *transitional T-cells* bilden sie die Brücke zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem und unterstützen deren mutualistische Interaktionen [22]. Ihre Fähigkeit, unabhängig von einer MHC-Restriktion Antigene, aber auch lösliche Proteine und nicht-Proteine endogenen Ursprungs zu erkennen, erlaubt es $\gamma\delta$ T-Zellen ihre distinkten Effektorfunktionen (Abb.2) im Rahmen einer Immunantwort schnell zu induzieren. Diese werden teilweise bereits intrathymisch festgelegt [26-28].

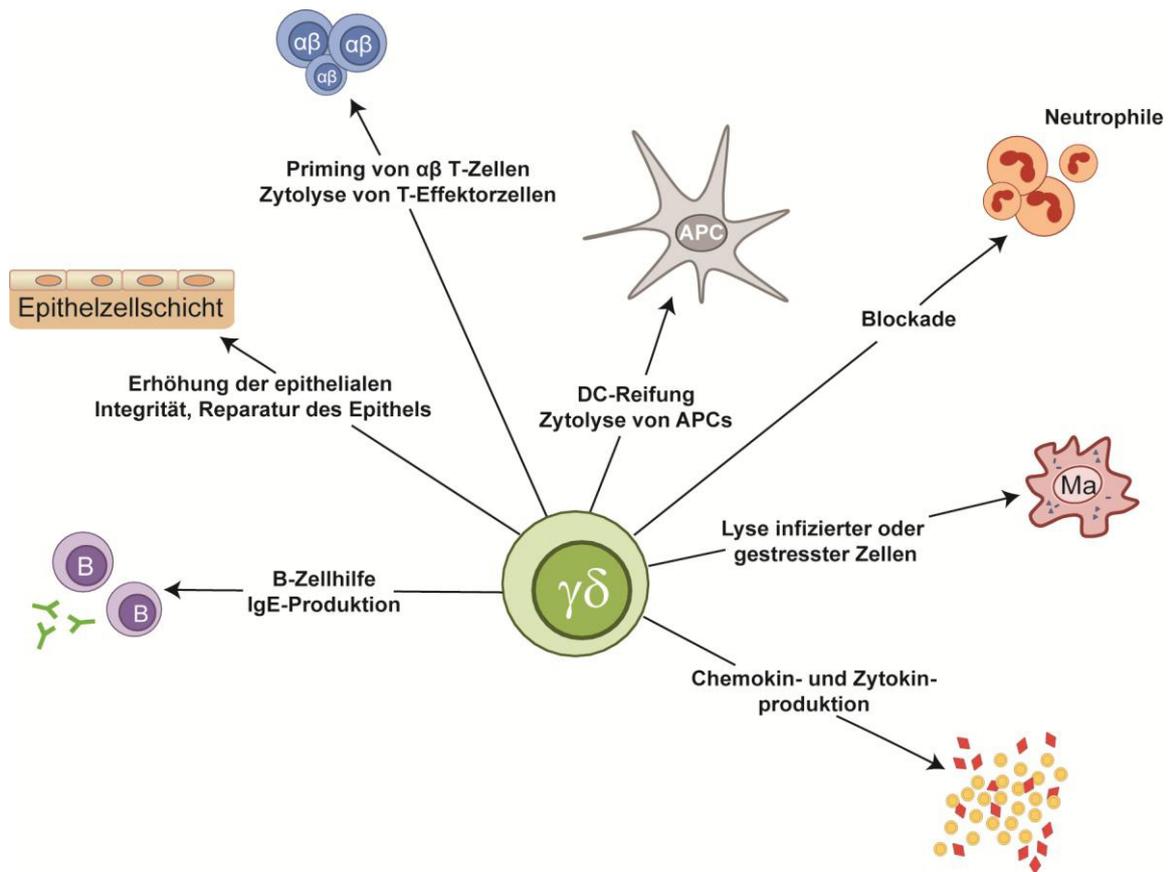


Abb. 2: Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen üben im Gewebe diverse Effektorfunktionen aus. Sie aktivieren B-Zellen und unterstützen diese bei der Produktion von Antikörpern wie IgE. Als intraepitheliale Lymphozyten (IELs) erhöhen sie über die Synthese von KGF-1 und antimikrobiellen Peptiden die epitheliale Integrität und tragen zur Reparatur des Epithels bei, wenn dieses durch Entzündung geschädigt wird. $\gamma\delta$ T-Zellen fördern in Interaktion mit $\alpha\beta$ T-Zellen über Antigenpräsentation deren Reifung, können aber andererseits auch T-Effektorzellen supprimieren. Außerdem sind sie in der Lage, die Lyse von Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen oder virusinfizierten bzw. gestressten Zellen wie Makrophagen zu induzieren. Über die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen können $\gamma\delta$ T-Zellen die Einwanderung und Rezirkulation von Immunzellen wie beispielsweise Neutrophilen zum Ort der Inflammation regulieren (modifiziert nach [25, 29]).

B, B-Zelle; $\alpha\beta$, $\alpha\beta$ T-Zelle; APC, Antigen-präsentierende Zelle; DC, dendritische Zelle; Ma, Makrophage

Eine Vielzahl der Hauptaufgaben von $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch wird erst in Abhängigkeit von der peripheren Mikroumgebung, zum Beispiel unter inflammatorischen Bedingungen, und ihrer Lokalisation im Gewebe festgelegt. Dies kennzeichnet gleichzeitig ihre funktionelle Kompetenz und Plastizität [22].

1.2 Mechanismen und Komponenten der Zellmigration

1.2.1 Das Vier-Stufen-Modell der Lymphozytenmigration

Zur effizienten Überwachung des menschlichen Organismus vor eingedrungenen Pathogenen oder Tumorzellen sowie zur Aufrechterhaltung der Homöostase in Geweben patrouillieren Blutleukozyten kontinuierlich durch den Körper. Dabei können Granulozyten und Monozyten des angeborenen Immunsystems chemotaktisch gesteuert an extravaskulär gelegene Orte der Entzündung und der Gewebszerstörung migrieren. Lymphozyten hingegen können in einem mehrstufigen Prozess, vermittelt über eine bestimmte Konstellation aus Adhäsionsmolekülen, Integrinen und Chemokinen auch durch gesunde, nicht-entzündliche Gewebe zirkulieren.

Im ersten Schritt des **Vier-Stufen-Modells der Leukozytenmigration** vermitteln Selektine die rollende Adhäsion der zirkulierenden Immunzellen an der Endothelschicht der Blutgefäße.

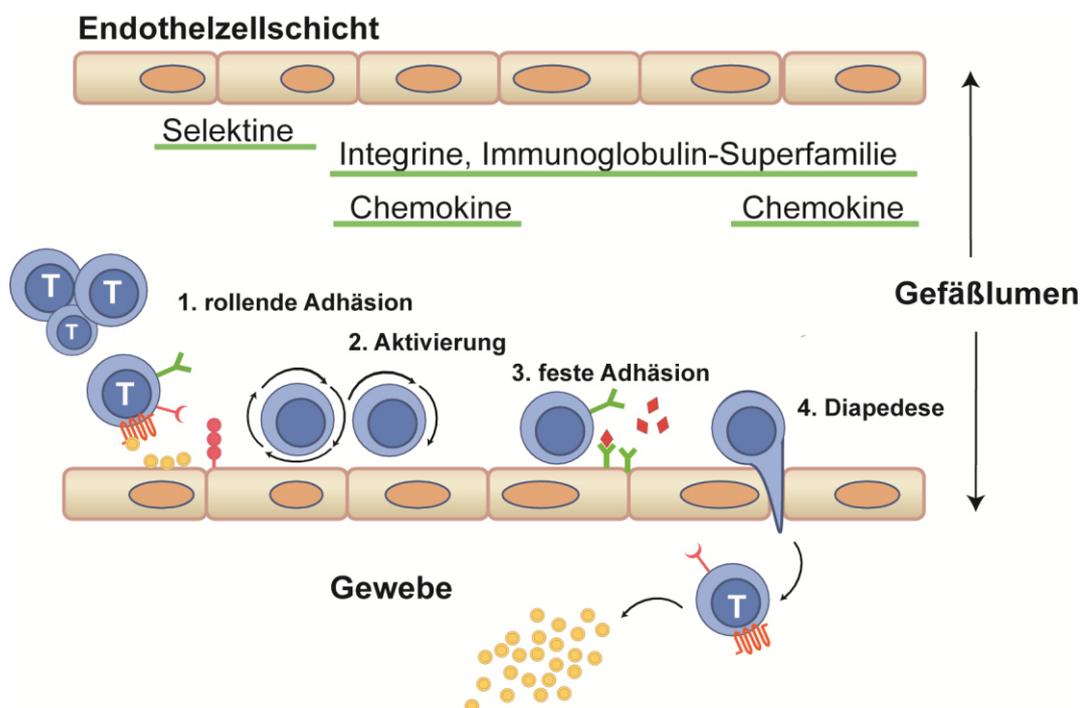


Abb. 3: Vier-Stufen-Modell der Leukozytenmigration

Extravasation einer naiven T-Zelle ins Gewebe in vier Schritten (rollende Adhäsion, Aktivierung, feste Adhäsion, Diapedese) und die bei diesem Prozess relevanten Rezeptor-Ligand-Interaktionen. (modifiziert nach [1, 30]).

Die Selektine (z.B. P-Selektin und L-Selektin) und ihre Oligosaccharid-basierten Liganden vermitteln hier die transiente, reversible Anbindung der Zellen und folglich auch Verminderung ihrer Strömungsgeschwindigkeit, was zu einem Rollen entlang des vaskulären Endothels führt (Abb.3). Im zweiten Schritt wird über Chemokine, die auf der Oberfläche der Endothelzellen

exprimiert oder von ihnen ausgeschüttet werden und an ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf den Leukozyten binden, eine Aktivierung und Konformationsänderung der Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie induziert. Dies führt zu einer Aktivierung mit nachfolgend fester Adhäsion des Leukozyten an der Endothelzellschicht [31]. Im letzten Schritt der Kaskade kommt es, ebenfalls vermittelt durch Chemokine und Integrine mit ihren dazugehörigen Liganden (z.B. MAdCAM-1, Fibronectin, ICAM-1 und VCAM-1), zu einer Transmigration (Diapedese) der Zellen in das umliegende Gewebe [30, 32] (Abb.3).

1.2.2 Klassifikation und Funktion des Chemokin-Chemokinrezeptorsystems

Chemokine, auch chemotaktisch wirkende Zytokine genannt, sind eine Gruppe kleiner (8-14kDa) Moleküle, die über die Interaktion mit ihren 7-Transmembrandomänen-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die gerichtete Migration von Zellen entlang eines chemotaktischen Gradienten (Chemotaxis) vermitteln [33]. Strukturell betrachtet kann man die Chemokine anhand ihrer NH₂-terminalen Cysteinymotive in vier Subklassen einteilen (C, CC, CXC und CX3C). Eine neuere Klassifikation unterteilt die Chemokine entsprechend ihrer physiologischen und funktionellen Charakteristiken in homöostatische, konstitutiv exprimierte und inflammatorische, induzierbare Chemokine [2, 34]. Aktuell umfasst das humane Chemokin-Chemokinrezeptorsystem mehr als 50 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren. Einige der Chemokin-Chemokinrezeptorpaare wie CCR6 und CCL20 sind exklusiv [35], andere Rezeptor-Ligandenpaare wie CCR2 sind durch hohe Redundanz und Bindungspromiskuität gekennzeichnet [33, 36]. Diese Eigenschaft reflektiert unter anderem auch die Fähigkeit des Chemokin-Chemokinrezeptorsystems, an der Regulation diverser biologischer Prozesse wie der Leukozytenmigration und der lymphoiden Organogenese beteiligt zu sein [37, 38].

Die inflammatorischen Chemokine vermitteln die Rekrutierung von Effektorzellen, unter ihnen Monozyten, Neutrophile und T-Effektorzellen zum Ort der Entzündung. Zu den bekanntesten Vertretern zählen IL-8, welches für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich ist und *monocyte chemotactic factor* (MCP-1), welches nach einem entzündlichen Stimulus Monozyten anlockt [39, 40]. Die konstitutive Expression homöostatischer Chemokine vermittelt die Überwachung des Immunsystems und die Leukozytenrezirkulation in lymphoiden und nicht-lymphoiden Kompartimenten des Körpers unter physiologischen Bedingungen. Die wichtigsten Repräsentanten der homöostatischen Chemokine sind CXCL13, CCL21, CCL19 und CXCL12 (SDF-1 α). Ihre Rezeptoren, CXCR5 für CXCL13 und CCR7 mit seinen Liganden CCL19 und CCL21, sind als Schlüsselmoleküle verantwortlich für die funktionelle Organisation sekundär lymphatischer Organe und den Eintritt von zirkulierenden Immunzellen in die T- und B-

Zellzonen [41]. Die Hauptfunktion von CXCR4 umfasst die gerichtete Migration von Stammzellen zu Speicher- und Funktionsorten von CXCL12 wie beispielsweise Knochenmark und Lunge [42].

1.2.3 Adhäsionsmoleküle und Integrine-Integrinliganden

An der Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Entzündung sind neben dem Chemokin-Chemokinrezeptorsystem auch verschiedene Adhäsionsmoleküle mit ihren entsprechenden Liganden beteiligt. Diese können strukturell in drei unterschiedliche Familien eingeteilt werden: Selektine, Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie [43] (Übersicht in Tab.1).

Die primäre, rollende Adhäsion der zirkulierenden Lymphozyten am Endothel wird über Selektine vermittelt. Die Membranglykoproteine P-Selektin und E-Selektin werden vom aktivierten Endothel exprimiert und führen über die Bindung ihrer fukosylierten Oligosaccharidliganden PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) und der Sialyl-Lewis*-Einheit zur Initiierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion. Auch L-Selektin (CD62L) ist ein bekannter *Homing*-Rezeptor, welcher den Eintritt zirkulierender Lymphozyten in SLO wie die Milz über hoch-endotheliale Venolen (HEVs) vermittelt [44, 45].

Der nächste Schritt des Vier-Stufen-Modells der Leukozytenmigration umfasst die feste Adhäsion der Leukozyten am vaskulären Endothel. Eine wichtige Rolle hierbei spielt die Interaktion zwischen den nicht-kovalenten, heterodimeren Proteinen der Integrin-Familie, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, und ihren Liganden. Bisher konnten bei höheren Vertebraten 18 α -Untereinheiten und acht β -Untereinheiten identifiziert werden, aus denen derzeit 24 $\alpha\beta$ -Kombinationen gebildet werden können [46]. Interessanterweise sind Integrine nicht nur Mediatoren der Zell-Zell, Zell-Pathogen und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktion, sondern auch beteiligt an Signaltransduktion und Prozessen im Intrazellularraum [47].

Phagozyten zum Beispiel exprimieren das Integrin LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*, CD11a/CD18 oder $\alpha_1\beta_2$) und können über die Bindung an dessen Liganden, ICAM-2 (*intracellular adhesion molecule-2*) in inflammatorisches Gewebe einwandern [2]. LFA-1 unterstützt aber auch die effektive T-Zellaktivierung, indem es die Interaktion zwischen einer naiven T-Zelle und einer APC vermittelt [48].

Tab. 1: Klassifizierung, Expression und Distribution der Adhäsionsmoleküle und Integrine mit ihren korrespondierenden Liganden

Adhäsionsmoleküle und Integrine der Lymphozyten		Name		Verteilung	Liganden
		alternativer Name	Integrin-Nomenklatur		
Selektine		P-Selektin		aktivierte EZ, Thrombozyten	PSGL-1, Sialyl-Lewis*
		E-Selektin		aktivierte EZ	Sialyl-Lewis*
Integrine		LFA-1	$\alpha L\beta 2$	T, MM, DC, N, NK	ICAM-1, -2, -3, -5
		Mac-1	$\alpha M\beta 2$	N, NK, MM	ICAM-1, Fibrinogen, iC3b
		VLA-4	$\alpha 4\beta 1$	B, T, MM	VCAM-1, Fibronektin
		VLA-5	$\alpha 5\beta 1$	MM, T	Fibronektin
		VLA-6	$\alpha 6\beta 1$	T	Laminin
Immunglobulin-Superfamilie		ICAM-1		aktivierte EZ, Leukozyten	LFA-1, Mac-1
		ICAM-2		DC, Endothel	LFA-1
		VCAM-1		aktivierte EZ	VLA-4

Tabellarische Übersicht der drei großen Gruppen der Adhäsionsmoleküle; der Selektine, Integrine und der Immunglobulin-Superfamilie mit ihren dazugehörigen Liganden. EZ, Endothelzelle; T, T-Lymphozyt; MM, Monozyten/Makrophagen; DC, dendritische Zelle; N, Neutrophile; NK, Natürliche Killerzelle; B, B-Zelle

Die dritte Familie der Adhäsionsmoleküle vereint die ICAMs, die zur großen Familie der Immunglobulin-ähnlichen Proteine gehören. Aktivierte Endothelzellen exprimieren ICAM-1 sowie ICAM-2 und vermitteln über die Bindung von LFA-1 und Mac1 die Leukozyten-Extravasation. VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1* oder CD106) und sein Ligand VLA-4 locken Monozyten an, die im Gewebe zu Makrophagen differenzieren und dann beispielsweise als „Schaumzellmakrophagen“ bei der Pathogenese der Arteriosklerose entscheidend mitwirken [49].

1.3 Die Peritonealhöhle als immunologisches Organ

Mit einer beim Menschen geschätzten Oberfläche von durchschnittlich 1,5-2m² bildet das Peritoneum als zarte Serosa die Wand der Peritonealhöhle (*lat. Cavitas peritonealis*) und des Retroperitonealraumes (*lat. Spatium retroperitoneale*). Die Bauchhöhle bezeichnet dabei den schmalen Raum zwischen den beiden Membranen, dem parietalem und dem viszeralem Blatt des Peritoneums. Das parietale Blatt kleidet die Innenseite der Bauchwand aus, das *Peritoneum*

viscerale überzieht die inneren Organe. Das Peritoneum sezerniert und absorbiert kontinuierlich 50-80 ml Peritonealflüssigkeit, die die Reibung herabsetzt und die Verschiebung der intraperitoneal gelegenen Organe gegeneinander erleichtert. Wird die Transportkapazität des drainierenden Lymphkapillarsystems überschritten, zum Beispiel bei Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose, sammelt sich die Interstitialflüssigkeit in der Bauchhöhle und es resultiert eine Bauchwassersucht (Aszites). Die äußerste Schicht des Peritoneums bildet das einschichtige Peritonealmesothel, dessen luminale Oberfläche mit Mikrovilli besetzt ist. An der Spitze der Mikrovilli können Leukozyten, u.a. Peritonealmakrophagen, über die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 anhaften und so die peritoneale Infektabwehr unterstützen [50, 51].

Eine wichtige strukturelle Komponente des Mesothels stellen die Milchflecken (*lat. Macula lactea, engl. milky spots*) dar, die besonders zahlreich im Omentum majus vorkommen. Hierbei handelt es sich um *Cluster* von Makrophagen (50-70 %), B1-Lymphozyten und T-Zellen (10-30 %) und wenigen Plasma- und Mastzellen. Dendritische Zellen und follikulär dendritische Zellen fehlen [52]. *Milky Spots* besitzen eine hohe Kapillardichte, unter anderem auch an HEVs mit ihren assoziierten *Homing*molekülen MAdCAM-1 und PNA_d (*peripheral lymph node addressin*), sodass eine Rezirkulation von Lymphozyten über die Milchflecken in die Peritonealhöhle gewährleistet ist. Für die Aufrechterhaltung der funktionellen Architektur der *milky spots* und die Lokalisation von B1-Zellen in Körperhöhlen wird dem Chemokin CXCL13 mit seinem korrespondierenden Rezeptor CXCR5 eine wichtige Rolle zugeschrieben [53]. Zu den Hauptaufgaben der Milchflecken zählen Antikörperproduktion, B- und T-Zellaktivierung [52].

Eine dominierende Zellpopulation neben den Peritonealmakrophagen stellen die B1-Zellen dar. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Differenzierung, phänotypischen und funktionellen Charakteristiken von B2-Zellen und kommen bevorzugt in Körperhöhlen wie dem Peritoneum und der Pleura vor [54, 55]. Bei adoptiven Transferexperimenten splenozytärer B1-Zellen und B2-Zellen in die Mikroumgebung des Peritoneums konnte gezeigt werden, dass diese den Phänotyp residenter, peritonealer B1- bzw. B2-Zellen annehmen. Im Fall der B2-Zellen kam es zu einer Hochregulation von CXCR5, β 7-Integrin und CXCR4. Folglich beeinflusst das Peritoneum nicht nur den Phänotyp, sondern auch die funktionellen Eigenschaften und das Wanderungsverhalten von B-Zellen [56, 57]. Zusätzlich zu seiner Rolle beim *Priming* von Leukozyten kann die Peritonealhöhle die Generierung eines organ- bzw. gewebsspezifischen Phänotyps von Leukozyten unterstützen. Nach intraperitonealem Transfer von splenozytären B2-Zellen erlangen diese einen Phänotyp, der sie zur Migration in die Lamina Propria (LP) des Dünndarms befähigt. Gleiches konnte für den Transfer von Plasmablasten gezeigt werden [56].

Diese Ergebnisse unterstützen nachhaltig die Hypothese, dass das Peritoneum eine besondere Rolle bei der Modulation immunologischer Prozesse im Körper spielt.

1.4 Das mukosale Immunsystem des Darms

1.4.1 Generelle Mechanismen der mukosalen Immunantworten im Darm

Die tägliche Konfrontation des menschlichen Organismus mit einer Vielzahl von toxischen und pathogenen Substanzen sowie den permanenten Stimuli harmloser Nahrungsantigene und der kommensalen Intestinalflora erfordert eine Generierung differenzierter Immunantworten. Das mukosale Immunsystem unterscheidet daher mit hoher Selektivität zwischen pathogenen und apathogenen Substanzen und es zählt zu seinen Hauptaufgaben, diese Funktion wirkungsvoll wahrzunehmen. Das MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) umfasst die Schleimhautschichten der Körperoberflächen einschließlich ihrer in Form von Mikrokompartmenten assoziierten lymphatischen Gewebe im oberen und unteren Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt. Peyer-Plaques im Dünndarm, isolierte lymphoide Follikel (ILF, *isolated lymphoid follicle*), diffus in der LP und im Epithel disseminierte Lymphozyten zusammen mit den mesenterialen Lymphknoten bilden das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*).

Im Dünndarm findet vor allem die enzymatische Nahrungsverdauung und Resorption statt. Seine Oberfläche wird dazu über Falten, Zotten (*Villus intestinales*) und Mikrovilli enorm vergrößert. Im Kolon fehlen die *Villi intestinales*; die Hauptaufgabe hier liegt in der Rückresorption von Wasser und Eindickung des Darminhalts. Die Darmschleimhaut konstituiert sich aus einer einschichtigen Epithelzellschicht, die als mechanische Barriere fungiert und darunterliegender Bindegewebsschicht, der LP. Im Epithel findet man Enterozyten, mit Mikrovilli besetzte Epithelzellen mit resorptiver Funktion, Becherzellen und M-Zellen (*microfold cells*). Die Enterozyten sind untereinander mit *tight-junctions* verbunden, geschlossene Zell-Zell-Kontakte, welche einen Teil der physischen Barriere bilden. Zusätzlich sezernieren Becherzellen basal Muzin, welches in Wasser die schleimhautschützende Mukusschicht bildet, die die komplette Darmoberfläche überzieht. M-Zellen lokalisieren zwischen den Enterozyten und kommen gehäuft in Peyer-Plaques vor. Sie nehmen luminal Antigene auf und schleusen sie über Transzytose zu den basal gelegenen Lymphozyten [58]. Auch dendritische Zellen, die an der Basis des Epithels sitzen, reichen mit ihren sternförmigen Fortsätzen ins Darmlumen und können so direkt Antigene aufnehmen. Intraepithelial gelegene Lymphozyten (IELs) stehen im

Verhältnis 1:10 zu den Epithelzellen. Bei Mäusen können zwei Subtypen unterschieden werden, abhängig davon welche Form des T-Zell-Korezeptors CD8 exprimiert wird: Typ-A-IELs mit konventionellem $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor und Typ-B-IELs, die das CD8 α -Homodimer entweder mit einem $\alpha\beta$ - oder einem $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor exprimieren [23, 59]. IELs unterstützen die Reparatur des intestinalen Epithels durch Zytokinsekretion wie KGF (*keratinocyte growth factor*) oder antiinflammatorischem TGF- β [60-62]. Das dominierende Immunglobulin der Schleimhäute ist IgA, das als Dimer von IgA-produzierenden Plasmazellen der LP produziert wird. Über Transzytose gelangt es an die Oberfläche, bindet über Kohlenhydratketten an die dortige Mukusschicht und neutralisiert unter anderem Viruspartikel und bakterielle Lipopolysaccharide. Zusätzlich zu den patrouillierenden Lymphozyten der LP verhindert es auch die Translokation kommensaler Bakterien durch die Epithelschicht [63]. Die kommensalen Mikroorganismen, auch Mikrobiota genannt, besiedeln mit 10^{14} - 10^{16} /mm² das gesunde Kolon. Ubiquitär vorkommende Kommensalen wie *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides fragiles*, *Escherichia coli* oder *Bifidobacterium spp.* wirken protektiv vor potentiellen Mikroben und können über Aktivierung des spezifischen Immunsystems zur Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase beitragen [64, 65]. Eine Übersicht über Mechanismen mukosaler Immunantworten am Beispiel des Dünndarms gibt Abb. 4.

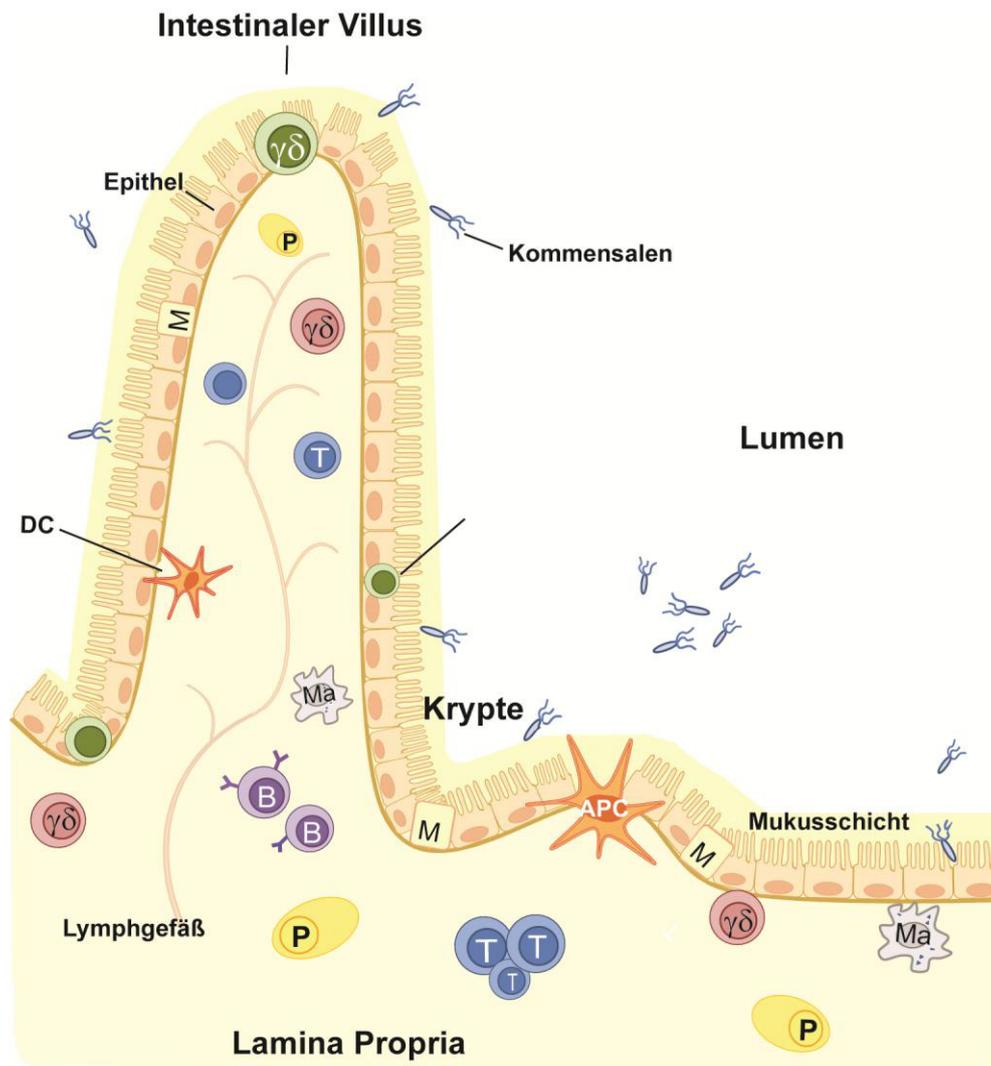


Abb. 4: Mechanismen der mukosalen Immunantwort am Beispiel des Dünndarms

Die kommensale Mikroflora im Lumen des Dünndarms wird durch eine einschichtige Epithelzellschicht, welche mit dem schützenden Mucus der Becherzellen bedeckt ist, von der LP getrennt. In dieser sitzen diverse Immunzellen, die vor eindringenden Bakterien schützen: Makrophagen phagozytieren eingedrungene Pathogene. Dendritische Zellen an der Basis des Epithels reichen mit ihren verzweigten Fortsätzen ins Darmlumen und nehmen dort Antigene auf. Das aufgenommene Antigen wird patrouillierenden T-Lymphozyten präsentiert, welche zur Differenzierung und Proliferation in T-Effektorzellen angeregt werden. B-Zellen der LP differenzieren in Plasmazellen und produzieren IgA. Dieses wird durch die Epithelschicht transportiert und schützt luminal vor Bakterien. $\gamma\delta$ T-Zellen zirkulieren kontinuierlich zwischen dem Epithel (dort als IELs) und der LP auf der Suche nach Mikroben. M-Zellen sitzen zwischen den Enterozyten und nehmen, ähnlich den dendritischen Zellen, über Transzytose Antigene auf und schleusen sie zu den basal gelegenen Lymphozyten. Über die Lymphgefäße der LP können Antigen-stimulierte T-Zellen den mesenterialen Lymphknoten erreichen und in die Zirkulation eintreten.

$\gamma\delta$, $\gamma\delta$ T-Zelle; DC, dendritische Zelle; P, Plasmazelle; M, M-Zelle; IEL, intraepithelialer Lymphozyt; T, T-Zelle; B, B-Zelle; Ma, Makrophage
(modifiziert nach [1, 2])

1.4.2 IL-17-vermittelte Immunität

Seit der Erstbeschreibung des Zytokins IL-17 im Jahr 1993 in T-Zellen [66] haben in den letzten zwei Jahrzehnten viele Forschungserkenntnisse zur weiteren Charakterisierung der im Jahr 2007 neu entdeckten dazugehörigen T-Effektorzellpopulation, den T_H17 -Zellen, beigetragen. Inzwischen wurden bereits diverse Immunzellen als IL-17-Produzenten identifiziert und in der Literatur wird eine komplette Zytokinfamilie als IL-17-Familie (IL-17A-F) beschrieben. IL-17 zählt neben IL-10 und IL-6 zu den proinflammatorischen Zytokinen, die über eine erhöhte Produktion von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen T-Zellen, DCs und Monozyten anlocken und eine Entzündung aufrechterhalten [67, 68]. In *in vitro* Stimulationsexperimenten naiver $CD4^+$ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-6 und TGF- β die Differenzierung in T_H17 -Zellen anregen [69]. IL-23 hingegen wird zur Aufrechterhaltung des T_H17 -Phänotyps oder weiteren Expansion benötigt [11, 70-73]. Als Mastertranskriptionsfaktor steuert ROR γ t, ein Mitglied der intrazellulären Transkriptionsfaktorfamilie *retinoic acid receptor-related orphan receptor*, die Differenzierung von T_H17 -Zellen [11, 74]. Längere Zeit wurde kontrovers diskutiert, ob eine Deletion von ROR γ t einen Effekt auf die Entwicklung intestinaler T-Zellpopulationen hat. Forscher postulierten dann 2008, dass eine ROR γ t-Defizienz weder einen Einfluss auf die absoluten Zahlen noch auf die Komposition der $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der LP und im IEL des Kolons hat. Hingegen ist bei einer ROR γ t-Deletion die Formation von Lymphknoten, der Peyerschen Plaques und der *Cryptopatches*, *Cluster* aus *Lymphoid tissue inducer cells* im Darm, beeinträchtigt [75-78]. Neben den $CD4^+$ T-Zellen des adaptiven Immunsystems können auch die in Kapitel 1.1.3 beschriebenen *innate-like lymphocytes*, wie iNKT cells oder $\gamma\delta$ T-Zellen IL-17 produzieren. Diese exprimieren konstitutiv die transkriptionellen Regulatoren der IL-17-Produktion, was ihnen bei einer Präsenz von PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), IL-23 oder IL-1 β innerhalb von vier bis acht Std. eine schnellere Polarisation in IL-17-produzierende Effektorzellen ermöglicht.

Als Wächter des Immunsystems sitzen die IL-17-produzierenden *innate-like lymphocytes* in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts, in der Haut und in der Lunge an der direkten Schnittstelle zwischen Wirt und Umwelt. Sie können so schnell auf eindringende Pathogene reagieren [74]. Zu den Hauptaufgaben von IL-17 zählt die Neutrophilenrekrutierung zum Ort der Infektion über die Induktion granulopoetischer Faktoren wie G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) oder CXCL-8 [79-81]. Außerdem erhöht es über die Formation von *tight-junctions* die epitheliale Integrität und schützt so vor eindringenden Mikroorganismen oder Kommensalen des Kolons. Einen weiteren schützenden Mechanismus stellt die Induktion antimikrobieller Proteine wie REG3 γ (*regenerating protein 3 γ*) oder Defensine dar [74, 82]. Inzwischen wurden auch

diverse Oberflächenrezeptoren identifiziert, die zum Beispiel zur Unterscheidung Zytokinproduzierender $\gamma\delta$ T-Zellen herangezogen werden. $CD3^+ CD27^- \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen verlassen den Thymus präaktiviert, um in der Peripherie IL-17 zu synthetisieren, im Gegensatz zu $CD3^+ CD27^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen, die intrathymisch bereits Antigenkontakt hatten und $INF\gamma$ produzieren [27, 28]. In der Peripherie exprimieren IL-17-Produzenten zusätzlich den Chemokinrezeptor CCR6, $INF\gamma$ -produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen hingegen sind $NK1.1^+$ [26]. Der Marker $NK1.1$ (*natural killer cell-associated marker NK1.1*) wurde ursprünglich als erster Marker zur Beschreibung der Natürlichen-Killer-T-Zellen herangezogen, eine T-Zellsubpopulation, die nicht mit den Natürlichen-Killer Zellen verwechselt werden darf.

1.4.3 Charakterisierung der akuten Kolitis

Die epitheliale Barriere des Kolons und die in der Schleimhaut lokalisierten Lymphozyten sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase. Wird diese, zum Beispiel bei Penetration von Bakterien, Viren, Pilzen oder Protozoen, gestört, so resultiert eine akute Entzündung im Darm. Inflammatorische Zytokine triggern dann intestinale Barrieredefekte, die im Fall einer akuten Entzündung über zytoskeletale Kontraktionen, bei chronischem Verlauf durch Veränderung der *tight junction*-Formation entstehen. Eine erhöhte Permeabilität der Membran ermöglicht eine Translokation von Kommensalen und den Influx bakterieller Liganden, die über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine weitere Immunzellen anlocken [83, 84]. Zudem kommt es unter entzündlichen Stimuli auch zu multiplen Veränderungen am vaskulären Endothel der LP. Adhäsionsmoleküle wie MadCAM-1, ICAM-1 sowie E- und P-Selektin werden verstärkt exprimiert und auch das Chemokinrezeptorprofil ändert sich [30]. Dadurch werden mukosale Rezirkulationsrouten verändert und das Migrationsverhalten von Lymphozyten beeinflusst. Typischerweise finden sich unter entzündlichen Bedingungen in der Darmschleimhaut lymphozytäre, granulocelluläre und plasmazelluläre Infiltrate. Histologische Untersuchungen zeigen weitere typische Merkmale einer akuten Inflammation: mukosale Erosionen, epitheliale Läsionen, fokale Ulzerationen, Krypt- und Becherzellverlust, epitheliale Hyperplasie und Ödeme. Bei der histologischen Einstufung ist auch relevant, ob es sich um einzelne entzündliche Infiltrate in der LP handelt oder ob alle Schleimhautschichten betroffen sind, also ein transmuraler Befall vorliegt [85]. Klinisch betrachtet, ist die akute Entzündung im Darm assoziiert mit abdominellen Schmerzen, teilweise blutigen Diarrhoen, Krämpfen, Gewichtsverlust und Fieber.

1.4.4 Kolitis-Tiermodelle

In den letzten 70 Jahren ist in den westlichen Ländern die Inzidenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) deutlich gestiegen. Die Neuerkrankungsrate an CU liegt in Europa jährlich bei neun bis zwölf Patienten pro 100000 Einwohner, für MC wird sie mit vier bis sieben auf 100000 Einwohner angegeben. In Deutschland wurde für beide Erkrankungen eine jährliche Inzidenz von fünf Neuerkrankungen ermittelt (Quelle DCCV e.V.). Es ist unumstritten, dass es sich bei der Pathogenese der CED um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Neben einer genetischen Disposition (für MC wurde zum Beispiel bereits ein genetischer Polymorphismus für den intrazellulären Rezeptor NOD2 als Ursache für die Krankheitsentstehung identifiziert [86, 87]) haben auch diverse *Lifestyle*-Faktoren wie Rauchen, Alkohol und ungesundes Ernährungsverhalten einen Einfluss. Wird durch diese Einflüsse der Dialog zwischen Mensch und Mikrobiota des Kolons gestört, so kann es zur Progression einer CED kommen [88]. Die kontinuierliche Entwicklung experimenteller CED-Tiermodelle hat in den letzten Jahren nicht nur dazu beigetragen, ein besseres Verständnis für Prozesse mukosaler Immunologie und der Ätiopathogenese der CED zu bekommen, sondern auch therapeutische Ansätze zu testen.

Tab. 2: Modelle experimenteller Kolitis

Experimentelle Modelle einer Kolitis				
spontan ausgelöst	induzierbar			
	Gen-Targeting <i>Knockout</i>	chemische Administration		immunologisch
SAMP1/Yit Maus C3H-HeJBir Maus	TGF- β IL-10 IL-2 MUC2 FOXP3 NEMO	oral	DSS Indomethacin	CD4 ⁺ CD45RB ^{hi} Transfer in <i>scid</i> oder <i>Rag</i> ^{-/-} Mäuse
		Einlauf	Oxazolone TNBS	Mikrobiota-reaktiver CD4 ⁺ T _H 1-Zelltransfer Mikrobiota-reaktiver CD4 ⁺ T _H 17-Zelltransfer

Tabellarische Übersicht über die Modelle experimenteller Kolitis. TGF- β , *transforming growth factor β* ; MUC2, *mucus gel-forming protein 2*; IL, Interleukin; FOXP3, *forkhead box P3*; NEMO *NF-B essential modulator*; DSS, Dextran-Sodium-Sulfat; TNBS, 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure; *Rag*, *recombination activating gene*; *scid*, *Severe Combined Immunodeficiency*

Allgemein kann man die CED-Tiermodelle in spontane und induzierbare klassifizieren, wobei den induzierbaren die chemischen, immunologischen und genetischen Modelle untergeordnet sind [89, 90]. Von den chemisch-induzierbaren Modellen werden die TNBS-induzierte Kolitis und die DSS-induzierte Kolitis am häufigsten verwendet. Bei der DSS-Kolitis kann über eine kontinuierliche Gabe der Chemikalie eine akute Entzündung im Kolon induziert werden, eine zyklische Administration von DSS im Trinkwasser über mindestens drei Wochen spiegelt die Situation einer chronischen Inflammation wieder. Eine allgemeine Übersicht über die in der Praxis gängigen Tiermodelle gibt Tab. 2 [91].

1.5 Einteilung, Symptomatik und Therapie der Kolitis beim Menschen

Der medizinische Begriff Kolitis umfasst die akut oder chronisch verlaufenden Entzündungen des Kolons. Neben der akuten Kolitis, die in Kapitel 1.4.3 bereits näher charakterisiert wurde, existieren auch die Strahlenkolitis, die mikroskopische Kolitis und infektiöse Koliden wie die bakteriell bedingte pseudomembranöse Kolitis, die bei Störung der Darmflora durch Antibiotikagabe mit resultierender Darmschädigung über eine Vermehrung von *Clostridium difficile* hervorgerufen wird. Zu den klinisch und histologisch definierten Hauptformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen der MC und die CU. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation, Ausbreitung, mikroskopischen sowie endoskopischen Charakteristika. Während bei der CU die Entzündung kontinuierlich vom Rektum nach proximal fortschreitet und im Schleimhautniveau bleibt, liegt beim MC ein diskontinuierlich-segmentaler, transmuraler Befall über den gesamten Gastrointestinaltrakt vor. Beim MC dominieren in der Histologie scharf begrenzte, aphtöse Ulzerationen und Epitheloidzellgranulome; in der Endoskopie zeigen sich häufig Fisteln und Stenosen. Charakteristischerweise ist das histologische Bild bei der CU von Epitheldysplasien, Kryptenabszessen und Schleimhautatrophien geprägt. Häufig bilden sich Pseudopolypen aus und die Patienten beklagen blut-schleimige Diarrhöen.

In den letzten Jahren hat sich in der Behandlung der CED ein breites Spektrum an antiinflammatorischen und immunsuppressiven- sowie modulierenden Medikamenten etabliert. Neben systemisch oder topisch wirksamen Kortikoiden wie Budesonid oder Prednisolon finden Immunsuppressiva wie Azathioprin und Tacrolimus therapeutische Anwendung. Die Calcineurininhibitoren supprimieren die Aktivierung von T-Zellen über die Hemmung der IL-2-Synthese [92, 93]. Neuere biotechnologische Forschungen haben in den 1990er Jahren den

monoklonalen Antikörper Infliximab auf den Markt gebracht, welcher hochspezifisch TNF- α blockiert. Das *Biological* wird häufig bei akuter Exazerbation oder schweren Schüben einer CED verwendet, wenn die konservative Therapie versagt [94-96]. Kommt es im Laufe einer CED zu einer Komplikation wie einer Darmobstruktion oder Perforation, kann auch eine chirurgische Intervention notwendig sein.

1.6 Aufgabenstellung

$\gamma\delta$ T-Zellen sind essentielle Mediatoren im Rahmen akut inflammatorischer Prozesse und verfügen über ein breites Repertoire an Effektorfunktionen, welche supportiv auf mukosale Immunantworten wirken. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die gewebsspezifischen Rekrutierungsmechanismen und die Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums unter nicht entzündlichen Bedingungen und im experimentellen Mausmodell der akuten DSS-Kolitis zu charakterisieren. Folgende Fragestellungen waren dabei von Interesse:

1. Welche phänotypischen Unterschiede bestehen zwischen peritonealen und splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen hinsichtlich der Expression spezifischer *Homing*rezeptoren, Chemokine sowie Adhäsionsmoleküle und Integrine?
2. Gibt es funktionelle Unterschiede bezüglich der Zytokinsekretion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz und denen des Peritoneums? Welche Marker dienen der näheren Charakterisierung IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen?
3. Wie unterscheiden sich peritoneale von splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen im Expressionsmuster für T-Helferzell-Differenzierungsmarker?
4. Spiegelt der Phänotyp peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen die unterschiedlichen $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen in der Lamina Propria und im intraepithelialen Kompartiment des Kolons wieder?
5. Können $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums mukosale Immunantworten im entzündeten Kolon unterstützen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Medien

ACK-Lysepuffer	8,29 g NH ₄ Cl, 1 g KHCO ₃ , 37,2 mg Na ₂ EDTA, ad 1 l H ₂ O, pH 7,3
FACS-Puffer	PBS, 2 % FKS, 0,01 M EDTA pH 8,0
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , ad 1l H ₂ O, pH 7.2
RPMI-Medium	500 ml RPMI (PAA, Colbe), 50 ml FKS (Lonza), 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml; PAA), 5 ml 200 mM Glutamin (PAA), 500 µl 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/ BRL) für primäre Mauslymphozyten

2.1.2 Chemikalien

Abbott GmbH:

Isofluoran (Florene)

Becton Dickenson:

Kollagen IV

Biochrom KG:

FKS, PBS (10x) w/o Ca²⁺ und Mg²⁺

Calbiochem:

DNase I

GE-Healthcare:

Percoll

Merck:

Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogencarbonat, Kaliumhydrogenphosphat,

Natriumacetat

Molecular Probes:

SNARF-1 Carbonsäureacetat-succinimidylester

MP Biomedicals:

Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)

NEB:

Bovines Serumalbumin 100x

PAA:

Hank's BSS, Hepes, Penicillin/Streptomycin 100x, RPMI 1640 Medium, Seren (Hamster, Maus, Ratte, Ziege, normales Kälberserum)

Roche:

Collagenase D

Roth AG:

Ammoniumchlorid, 1,4 Dithiothreit (DTT), Ethanol, Kaliumchlorid, β -Mercaptoethanol, Natriumchlorid, RNase Away

Sigma-Aldrich:

Brefeldin A, Ionomycin-Calciumsalz, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Pertussis-Toxin, Trypanblau-Lösung (0,4 %)

2.1.3 Antikörper und Streptavidin-Konjugate

Tab. 3: Primärantikörper

Name/Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Referenz
CCR6-APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	R&D
CCR6-PE	Ratte IgG1 mAK; anti-Maus	R&D
CCR9-FITC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CCR10-APC	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	R&D
CD3-APC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD3-FITC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD3-PE	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD3-PerCP	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD3-Pacific Blue	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD3-Brilliant Violet	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD8 α -APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD16/32	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CD25-PE	Ratte IgG1 mAK; anti-Maus	Biolegend
CD27-APC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD29-biotin	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD44-PE	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD45-Pacific Blue	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD45.1-FITC	Maus IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences

Forts. Tab. 3: Primärantikörper

CD45.2-FITC	Maus (SJL) IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD45.2-Pacific Blue	Maus (SJL) IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD49d-biotin	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD62L-FITC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD69-FITC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
CD69-PE	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
B220-APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
B220-FITC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
B220-Pacific Blue	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
B220-PerCP	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
IL-17A-APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	eBioscience
IL-17A-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
INF γ -FITC	Ratte IgG1 mAK; anti-Maus	eBioscience
β 7-Integrin-biotin	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
LFA-1	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
$\gamma\delta$ TCR-APC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
$\gamma\delta$ TCR-FITC	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
$\gamma\delta$ TCR-PE	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
ROR γ t-purified	anti-Maus	eBioscience

Sekundärantikörper und Streptavidin-Konjugate:

BD Biosciences:

Streptavidin (PE)

Biologend:

Streptavidin (FITC, APC, PE)

eBioscience:

anti-Ratte FITC (Isotyp: Esel anti Ratte IgG)

2.1.4 Rekombinante Proteine

R&D:

CCL28, CXCL12

2.1.5 Kits

Agilent:

Agilent RNA 6000 Pico Kit

Invitrogen:

cDNA Synthesis Kit, Fix & Perm cell permeabilization kit

Miltenyi Biotech:

Pan T Cell Isolation Kit II

SA Bioscience:

RT2 Profiler PCR Array (T Helper Cell Differentiation)

Qiagen:

RNase-free DNase Set, Rneasy Micro/Mini Kit

2.1.6 Mäuse

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten C57BL/6 Wildtyp (CD45.2⁺) und C57BL/6 Ly5.1 (CD45.1⁺) kongenen Mäuse stammten aus der Zucht der Arbeitsgruppe, die innerhalb der Tiereinrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin (MDC) durchgeführt wurde. C57BL/6 Wildtyp (CD45.2⁺) Mäuse wurden von Charles River (Wilmington, MA, USA) bezogen. Weibliche und männliche CCR6^{-/-} sowie ROR γ t^{-/-} Mäuse wurden wie beschrieben generiert [75, 97] und stammten ebenfalls aus der Zucht in der Tiereinrichtung des MDC. Alle Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen entsprechend nationaler Richtlinien gehalten und Tiertötungen und Tierversuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin) (O 0369/09; G 0371/05 und G 0183/07) genehmigt.

2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agilent Technologies:

Bioanalyzer 2100

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH:

Reinluftbank für die Zellkultur

Beckman Instruments GmbH:

Zentrifugen (GS-6KR und J2-MC)

Becton-Dickinson:

Durchflusszytometer (FACS Calibur, FACS Canto, FACS Aria I, II und III), BD FACS Flow,

5 ml Polystyrol-Rundboden-Röhrchen (mit oder ohne Cell Strainer), Einfrierboxen, Einwegspritzen (50 ml), sterile 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen, Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten, Zellsiebe (40 µm, 70 µm, 100 µm)

Bender & Hobein AG:

Vortex Genie 2

BioRad Laboratories:

qPCR-Thermocycler iQ5, DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler

Biozym:

Pipettenspitzen

Braun AG:

Kanülen, Einmalspritzen

Buchner Laborservice:

Bakterien-Schüttler

Corning Incorporated:

Reagenz-Reservoir aus Polystyren, Zellschaber, Transwell® Permeable Support

Eppendorf:

Heizblock, Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, Thermomixer 5436

GE Healthcare:

Amersham Hybond ECL

Gesellschaft für Labortechnik GmbH:

Inkubationswasserbad

Greiner Bio-One:

Mikrobiologische Zellkulturschalen, sterile 12 ml und 50 ml Röhrchen, serologische Pipetten, Plastikpasteurpipetten

Heraeus:

Brutschränke, Zellkultur-Inkubatoren, Kühlzentrifuge Multifuge 4KR

IKA Labortechnik:

MS3 Vortexer

Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH:

Schütteltisch ST5

Innovatis:

CASY® Cell Counter TTC, CASYton

Integra Biosciences:

Pipetman

Kimberley-Clark Professional:

Kimtech Science Wischtücher

LO-Laboroptik GmbH:

Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe)

Mettler Toledo:

Analytische Feinwaage, Pipettenspitzen (Rainin), pH-Meter Seven Easy

Miltenyi Biotec:

MACS Separation Columns (MS, LS, LD), MACS Separator

Pechiney Plastic Packaging:

Parafilm

C. Roth:

Glaspasteurpipetten

Sänger:

Einmalhandschuhe

Sartorius:

Tischwaage

Schleicher & Schuell:

sterile Spritzenfilter 25 mm mit 0,2 µm und 0,45 µm Porengröße, Faltenfilter,

Nitrozellulosemembran

Schott:

Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Glaspipetten, Glasflaschen, sonstige Glasgeräte

Schreiber GmbH:

Chirurgische Instrumente

Thermo Scientific:

Tiefkühlschränke (-86°C), IEC Micromax Tischzentrifuge

TPP Techno Plastic Products AG:

Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten, Vakuumfilter mit Flasche (500 ml)

VWR International GmbH:

Petrischalen

2.1.8 Software

Adobe:

Illustrator CS4

Becton Dickinson:

FACSDiva

Flowjo:

Flowjo 9.3.3

GraphPad Software, Inc.:

GraphPad Prism 5

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von primären mononukleären Zellen

2.2.1.1.1 Erythrozyten-Lyse

Die aus Milz, Thymus oder Peritoneum gewonnenen Zellen wurden je nach Zellzahl/ml für 3-5 min bei RT in 7 ml hypotonem ACK-Lysepuffer inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit FACS-Puffer auf 15 ml aufgefüllt, für 8 min bei 300 x g und 7°C zentrifugiert, erneut gewaschen und abschließend in FACS-Puffer resuspendiert.

ACK-Lysepuffer: 8,29 g NH₄Cl; 1 g KHCO₃; 37,2 mg Na₂EDTA; ad 1 l H₂O; pH 7,3

FACS-Puffer: PBS, 2 % FKS, 0,01 M EDTA pH 8,0

2.2.1.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus Milz und Thymus

Zur Isolierung muriner Splenozyten und Thymozyten wurden die Organe steril prepariert und in FACS-Puffer in einer 60 mm Schale mit dem Stempel einer 2 ml Spritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde mit einer 10 ml Pipette mehrmals auf- und abpipettiert, um noch vorhandene Zellklumpen zu beseitigen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz (40 µm) filtriert und für 8 min bei 300 x g und 7°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Depletion der Erythrozyten in ACK-Lysepuffer aufgenommen, für 3 min bei RT inkubiert, anschließend zwei Mal gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.1.1.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Peritoneum

Zur Untersuchung mononukleärer Zellen der Bauchhöhle wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Hierfür wurde bei Mäusen nach letaler Isoflurannarkose das Bauchfell desinfiziert, angehoben und wenige Millimeter eingeschnitten. Die Freilegung des Peritoneums erfolgte durch simultanen caudalen und cranialen Zug. Es wurden 10 ml FACS-Puffer in den Bauchraum injiziert und bei leichter Massage des Peritoneums reaspiert. Auf diese Weise konnten nach Wiederholung des Vorgangs ca. $2-4 \times 10^6$ Peritonealzellen gewonnen werden. Die Zellsuspension wurde anschließend für 8 min bei $300 \times g$ und 7°C zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.1.1.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Für durchflusszytometrische Messungen wurde die Zellzahl mithilfe der CASYton-Technologie (Innovatis) bestimmt. Bei Transferexperimenten und Migrationsassays erfolgte die Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauerzählkammer. Dazu wurden 10 μl der Zellsuspension mit 990 μl einer in PBS 1: 2 vorverdünnten 0,4 %-igen Trypanblaulösung gemischt. Die Auszählung vitaler, ungefärbter Zellen in den vier Quadranten und Einberechnung der Vorverdünnung ergab nach folgender Gleichung die Zellzahl pro ml:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4$$

2.2.1.1.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Kolon

Zur Gewinnung muriner Lymphozyten aus der Lamina Propria (LP) und dem intraepithelialen Kompartiment (IEL) wurde das Kolon der Maus nach Entnahme von Faeces befreit, längs aufgeschnitten und in einer 100 mm Zellkulturschale in 1 x PBS gespült. Im Anschluss wurde das entnommene Kolon in ca. $0,5 \text{ cm}^2$ große Stücke geschnitten und in 20 ml HBSS/0,1 M EDTA/ DTT/ FKS-Lösung bei 240 rpm und 37°C schüttelnd inkubiert. Zur Gewinnung der IELs wurden während der 30-minütigen Inkubationszeit das Medium ein Mal gewechselt und die Überstände über einen 100 μm Cellstrainer in ein neues 50 ml Tube pipettiert und gesammelt. Im Anschluss wurden die Überstände für 10 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Die Kolonstücke wurden zwei Mal mit 20 ml Medium gewaschen und zentrifugiert (10 min, $300 \times g$, RT). Zur Gewinnung der LPL wurde das Pellet nach Zentrifugation in Kollagenasemedium aufgenommen und für 90 min schüttelnd bei 200 rpm inkubiert. Im Anschluss des Verdaus von DNA und Gewebe wurde die Zellsuspension mithilfe einer 20 ml Spritze durch einen 70 μm Cellstrainer gegeben, mit Medium nachgespült und zentrifugiert (10 min, $300 \times g$, RT). Die gewonnenen

Zellpellets aus IEL- und LP-Isolation wurden danach einer Percoll-Dichtezentrifugation unterworfen. Dazu wurde das Zellpellet in 5 ml einer 40 % Percoll-Lösung aufgenommen und auf 5 ml einer 100 % Percoll-Lösung geschichtet. Der Leukozytenring wurde nach Dichtegradientenzentrifugation (25 min, 1200 x g, RT, ohne Bremse) aus der Interphase abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, zwei Mal mit Medium gewaschen und zentrifugiert (10 min, 300 x g, RT). Das gewonnene Pellet wurde abschließend in FACS-Puffer resuspendiert.

HBSS/EDTA/DTT: HBSS (w/o Mg/Ca), 8 % FKS, 5 mM EDTA, 1 mM DTT

Medium: RPMI 1640, 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 50 nM β -Mercaptoethanol

Kollagenase-Medium: Medium versetzt mit 1 mg/ml Collagenase D (Roche) und 20 μ g/ml

DNase I

100 % Percoll-Lösung: 9 Teile Percoll (Dichte 1,13 g/ml), 1 Teil 10-fach PBS

40 % Percoll-Lösung: 4 Teile 100 % Percoll-Lösung, 6 Teile Medium (ohne β -Mercaptoethanol)

2.2.1.1.6 Anreicherung von T-Zellen mittels MACS

Für die adoptiven und kompetitiven Zell-Transferexperimente und zur Gewinnung von RNA wurden Splenozyten mit dem Pan T Cell Isolation Kit II (Milteny Biotec) zur Depletion von B-Zellen und Anreicherung von CD3⁺ T-Zellen einer Zellseparation unterzogen.

Bei der magnetischen Zellseparation (*MACS - Magnetic Activated Cell Sorting*) wurden die Splenozyten in einem ersten Schritt für 15 min bei 4°C leicht schüttelnd mit Antikörpern, die sich gegen Oberflächenantigene von B-Zellen richten, inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Kopplung an Microbeads, magnetische Partikel, die sich gegen die Antikörper richten. Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt über eine Trennsäule (LS-Säulen von Milteny Biotec für 1×10^9 Zellen) gegeben, in der ein Permanentmagnetfeld von einer Matrix aus Stahlwolle oder Eisenkugeln umgeben ist. Die magnetisch gekoppelten Zellen, in diesem Fall die B-Zellen, wurden negativ selektioniert und verbleiben in der Säule, während die unmarkierten, angereicherten CD3⁺ T-Zellen diese durchlaufen. Die gewonnenen Zellen wurden 2 Mal gewaschen, in 1 x PBS aufgenommen und in die unter DSS gesetzten Empfängertiere injiziert bzw. für die Gewinnung der RNA weiterverwendet.

2.2.1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion intra- oder extrazellulär exprimierter Antigene mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Dabei passieren die in FACS-Puffer aufgenommenen Zellen verschiedene Laser im Durchflusszytometer, was zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe führt. Licht verschiedener Wellenlängen wird je nach Antikörper emittiert und durch verschiedene Photozellen detektiert. Die anschließende Auswertung der Messsignale und die graphische Darstellung erfolgt über die Verbindung mit einem Computer. Neben der Unterscheidung verschiedener Zellsubpopulationen durch die Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper können über *Forward Scatter* (FSC) und *Sideward Scatter* (SSC) auch morphologische Charakteristika der Zellen bestimmt werden (Größe und Granularität).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in Mikrotiterplatten überführt und für 20 min auf Eis in 150 μ l FACS-Puffer / 2,5 % Serum geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 min bei 300 x g und 7°C zentrifugiert, in 100 μ l der in FACS-Puffer verdünnten direktgekoppelten Primäntikörper aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Wurde im ersten Schritt ein biotinylierter Antikörper verwendet, erfolgte nach zwei Waschschritten eine Inkubation für 20 min mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Streptavidin. Abschließend folgten zwei Waschschrritte. Das gewonnene Zellpellett wurde in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit dem FACS Calibur (Becton Dickinson) gemessen.

2.2.1.3 Detektion von intrazellulären INF γ und IL-17

Für die Bestimmung der intrazellulären Zytokine INF γ und IL-17A (nachfolgend als IL-17 abgekürzt) in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen wurden diese zunächst wie in Kap 2.1.1.3 beschrieben aus dem Peritoneum isoliert. Die Zellsuspensionen wurden in sterilen 20 ml Zellkulturflaschen in RPMI-Kulturmedium für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Dieses enthielt neben 10 % FKS auch Ionomycin (1,5 μ g/ml) und PMA (40 ng/ml) zur Stimulation der intrazellulären Zytokinsekretion sowie Brefeldin A (20 μ g/ml) zum Stopp des Protein-Vesikeltransports im Golgi-Apparat. Nach Ernten der Zellen wurden die extrazellulären Oberflächenmarker B220, CD3, $\gamma\delta$ TCR und CCR6 detektiert, worauf die Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran mithilfe des Fix&Perm Kits (Invitrogen) folgte. Abschließend wurde für 15 min bei RT mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert, die sich gegen die intrazellulären Zytokine richten. Die Expression von INF γ und IL-17 sowie der Oberflächenantigene wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

2.2.1.4 Migrationsassays

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit peritonealer Lymphozyten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Chemokins CCL28 wurde ein *in vitro* Chemotaxis Assay durchgeführt. Dazu wurden am Vortag die Einsätze einer 3 µm Transwell Platte mit einer Kollagenlösung beschichtet (20 µg/ml Typ IV Kollagen (R&D) in 0,05 M HCl) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Einsätze 5 Mal mit 1xPBS gewaschen und leicht angetrocknet. Von der CCL28-Lösung (100, 300 nM) wurden 500 µl in die untere Kammer pipettiert. Als Positivkontrolle wurde CXCL12/SDF1α verwendet, als Negativkontrolle diente Migrationsmedium ohne Chemokinzusatz. In die obere Kammer wurden pro Ansatz 1 x 10⁶ Peritonealzellen in 100 µl Migrationsmedium gegeben und die Transwell-Einsätze im Anschluss luftblasenfrei in die Chemokinlösung gehängt. Die Platte wurde für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Nach der Migrationszeit wurden 400 µl aus der unteren Kammer abgenommen, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde für die durchflusszytometrische Bestimmung abgenommen. Die Zellzählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer, der chemotaktische Index ergab sich aus folgender Gleichung:

Chemotaktischer Index = (Anzahl Zellen + Chemokin) / (Anzahl Zellen ohne Chemokin)

Migrationsmedium: RPMI 1640; 1 x Penicillin/Streptomycin; 1 % BSA; 25 mM Hepes

2.2.1.5 Zellsortierung

Für die Isolation von RNA aus peritonealen und splenozytären γδ T-Zellen wurden Zellsuspensionen nach Peritoneallavage und Milzisolierung mit dem FACS Aria I, II oder III (Becton Dickinson) sortiert. Dazu wurden die Splenozyten zunächst einer MACS-Zellseparation zur Anreicherung der γδ T-Zellen unterzogen (Kap. 2.1.1.1.6). Im Anschluss wurden die isolierten Zellen mit anti-CD3 und anti-γδ TCR für 30 min schüttelnd bei 4°C inkubiert. Die peritonealen Zellen wurden zusätzlich mit anti-B220 gefärbt. Nach Antikörperinkubation wurden die Zellen zwei Mal mit sterilem FACS-Puffer gewaschen und im Anschluss am FACS Aria sortiert. Die peritonealen γδ T-Zellen wurden direkt in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube mit entsprechendem Volumen RLT-Puffer (RNAeasy Micro Kit), welchem vorher β-Mercaptoethanol zugesetzt wurde, sortiert. Die splenozytären γδ T-Zellen wurden in 2 ml steriles FKS sortiert und im Anschluss ein Mal mit 1 x PBS gewaschen. Direkt nach der Zellsortierung folgte die Isolierung der RNA.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von RNA aus peritonealen und splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Isolierung von RNA erfolgte für die peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen mithilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen). Die splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen wurden mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Beide Kits basieren auf der Silica-Gel-Membran-Technologie und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Die sortierten Zellen (Kap. 2.2.1.5) wurden in 350 μ l RLT-Puffer aufgenommen, welcher β -Mercaptoethanol und Guanidin-Isothiocyanat enthält. Diese Substanzen wirken RNase-inaktivierend und denaturierend. Es folgte die Zugabe von Ethanol. Das Zelllysat wurde anschließend auf die RNeasy MinElute Säule aufgetragen und für 15 Sek. bei 8000 x g zentrifugiert. Dabei wird die RNA an die Silica-Gel-Membran adsorbiert. Die Zugabe von Ethanol führt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen OH-Silikat-Atomen der Membran und den Nukleinsäuremolekülen. Dies unterstützt eine selektive Bindung der RNA an die Membran. Nach einem Waschschrift wurde die gebundene RNA für 15 min bei RT mit DNase I (RNase free DNase Set, Qiagen) inkubiert. Es folgten weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte. Die eluierte splenozytäre RNA wurde in 30 μ l RNase freiem Wasser aufgenommen, die peritoneale RNA in 14 μ l. Die gewonnenen Zelllysate wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Überprüfung der RNA-Qualität

Zur Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der RNA wurde das RNA 6000 Pico Kit (Agilent) nach Angaben des Herstellers verwendet, welches sich besonders für Proben mit geringer RNA-Konzentration eignet. Diese wurden vor Auftragen auf den Pico Chip für 2 min bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen zu minimieren. Im Anschluss erfolgte die Analyse mit dem Bioanalyser 2100. Dieser führt, basierend auf Mikrofluidtechnik, eine kapillarelektrophoretische Auftrennung der farbstoffmarkierten Nukleinsäuren durch. Anschließend werden die 18S und 28S Bande der eukaryontischen ribosomalen RNA mittels laserinduzierter Fluoreszenz detektiert. Die Agilent 2100 Expert Software generiert automatisch den RIN-Wert (*RNA integrity number*), welcher die RNA auf einer Skala von 1 bis 10 bezüglich ihrer Integrität charakterisiert. Vollständig degradierte RNA entspricht einem RIN-Wert von 1, RNA ohne Degradation würde einen Maximalwert von 10 erreichen.

Für die qPCR Arrays wurde RNA verwendet, die mindestens einen RIN-Wert von 8 erreicht.

2.2.2.3 Reverse Transkription zur Herstellung komplementärer DNA

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA aus mRNA wurde das First Strand Synthesis Kit (SABiosciences) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss wurden qPCR Arrays (SABiosciences) durchgeführt.

2.2.2.4 qPCR Arrays

Für die vergleichende Analyse der Genexpressionslevel von peritonealen und splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen wurden qPCRs im Array-Format durchgeführt. Es wurde der T Helper Cell Differentiation PCR Array (SABiosciences) verwendet. Mithilfe der RT2 Profiler PCR können auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte 84 verschiedene Gene, die Teil bestimmter Prozesse oder eines bestimmten Signalwegs sind, gleichzeitig untersucht werden. Automatisch werden auch fünf konstitutiv exprimierte Kontrollgene (*housekeeping genes*), β -Glucuronidase, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, Hitzschockprotein HSP 90 α , Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Actin analysiert. Das Protokoll für die qPCR-Arrays wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.3.1 DSS-induzierte Kolitis

Für die Induktion einer akuten Darmentzündung wurde 6 bis 8 Wochen alten kongenen C57Bl/6/Ly5.1 Wt-Mäusen DSS (Dextran-Natrium-Sulfat), ein sulfatiertes Polysaccharid, für 4 bis 5 Tage peroral in unbehandeltem Trinkwasser verabreicht. Zur Herstellung einer 3 % DSS-Lösung wurden 6 g des weißen Pulvers in 200 ml Leitungswasser gelöst. Die DSS-Lösungen wurden nach 3 bis 4 Tagen erneuert. Zur Einschätzung der Entzündungssituation im Kolon der Mäuse wurden Stuhlkonsistenz und Gewichtsverlust als Parameter herangezogen.

2.2.3.2 Adoptiver und kompetitiver Zelltransfer

2.2.3.2.1 Transferexperimente

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon wurden Splenozyten von C57Bl/6/Ly5.2 Mäusen oder RFP Tieren mit rot fluoreszierenden Zellen isoliert und die CD3⁺ T-Zellen positiv mittels MACS-Zellseparation angereichert (siehe Kapitel 2.2.1.1.6). Die Zellen wurden im Anschluss in 1 x PBS aufgenommen und je 3-5 x 10⁷ Zellen/300 μ l intraperitoneal in drei C57Bl/6/Ly5.1 Rezipienten injiziert, denen seit 4 Tagen DSS peroral verabreicht wurde. 24 Std. bzw. 36 Std. nach adoptivem T-Zelltransfer wurden die

Empfängertiere getötet. Zellen aus Milz und Peritoneallavage wurden aufgereinigt, mittels Durchflusszytometrie untersucht und zur Überprüfung einer erfolgreichen intraperitonealen Injektion herangezogen. Für die Isolation der Lymphozyten aus der LP und dem IEL des Kolons der drei Rezipienten wurden die gewonnenen Zellpellets zunächst einzeln einer Percoll-Dichtezentrifugation unterworfen (siehe Kapitel 2.2.1.1.5). Für die durchflusszytometrische Analyse im Anschluss wurden die drei Zellpellets gepoolt. Als Kontrolle dienten C57Bl/6/Ly5.1 Mäuse, denen keine Zellen transferiert wurden.

Zur Bestätigung, dass es sich bei der Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Peritonealhöhle in das Kolon um einen aktiven, chemokinrezeptorabhängigen Prozess handelt, wurden in einem weiteren Ansatz MACS-angereicherte $CD3^+$ T-Zellen mit Pertussis-Toxin behandelt. Dieses inhibiert die $G_{i\alpha}$ -Untereinheit $G_{i\alpha}$ -gekoppelter Chemokinrezeptoren und hemmt deren Signaltransduktionsprozesse.

Nach Protokoll von Jason Cyster und Kollegen [98] wurden 3×10^7 Zellen/1 ml Medium nach MACS-Anreicherung für 2 Std. bei 37°C in einer 6-Well-Platte mit 100 ng/ml Pertussis-Toxin (Sigma Aldrich) inkubiert. Nach Ernten der Zellen wurden diese mit 1 x PBS gewaschen, die Zellzahl erneut bestimmt und je $3-4 \times 10^8$ Zellen intraperitoneal in drei DSS-Empfängertiere injiziert. Als Kontrolle dienten Pertussis-unbehandelte Zellen, die wie oben beschrieben für 2 Std. in Medium inkubiert und ebenfalls in drei Kontrolltiere injiziert wurden. 24 Std. nach Transfer erfolgte die vergleichende Analyse der Empfängertiere.

2.2.3.2.2 Kompetitiver Transfer

Zum Vergleich des Rekrutierungsverhaltens intraperitoneal versus intravenös applizierter $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon wurden kompetitive Transferexperimente durchgeführt. Dazu wurden Milzen von C57Bl/6/Ly5.2 Wt-Mäusen oder RFP Mäusen isoliert und die $CD3^+$ T-Zellen mittels MACS angereichert. Zuerst erfolgte die Injektion von ca. 3×10^7 Splenozyten aus Wt-Mäusen in das Peritoneum der DSS-Empfängertiere. Nach 30 min wurden ca. $1,5 \times 10^7$ Zellen aus RFP-Mäusen oder SNARF-gelabelte, mit einem Farbstoff markierte, Splenozyten aus Wt-Tieren intravenös injiziert. 24 Std. nach Transfer erfolgte die Aufarbeitung und Analyse der Mäuse.

2.2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde die Software GraphPad-Prism Version 5.0 verwendet. Entsprechend der einzelnen Fragestellungen wurde entweder der ungepaarte Mann-Whitney-Test oder der ungepaarte Student's t-Test angewendet. Messwerte von $p \leq 0.05$ gelten

als statistisch signifikant. Dem statistischen Ergebnis ist gleichzeitig immer eine Angabe über den verwendeten Test zugeordnet. P-Werte ≤ 0.05 wurden mit einem Stern, ≤ 0.01 mit zwei Sternen und ≤ 0.001 mit drei Sternen gekennzeichnet.

3. ERGEBNISTEIL

3.1 Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellsubtypen in Milz, Peritoneum und Kolon unter homöostatischen Bedingungen

In den vergangenen drei Dekaden wurde die gewebspezifische und organspezifische Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellen unter anderem im Schwein, der Ratte und dem Rind analysiert, wobei eine große Diversität im Verteilungsmuster in Abhängigkeit von der Spezies und dem Gewebe evident wurde. Bei der Maus konnten $\gamma\delta$ T-Zellen vorrangig in epithelreichen Geweben wie zum Beispiel der Epidermis der Haut identifiziert werden. Hier stellen sie mit ca. 90 % aller T-Zellen die dominierende Zellpopulation dar und werden auch als dendritisch epidermale Zellen bezeichnet [99, 100]. Im humanen System hingegen sind die $\gamma\delta$ T-Zellen in der Epidermis in der Minderheit. Mit weniger als 1-20 % der peripher zirkulierenden T-Zellen im Blut repräsentieren sie hier eine kleine Population. Lediglich im menschlichen Kolon ist der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen mit ca. 10-40 % hoch und die Situation somit vergleichbar mit dem murinen System [101].

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit soll eine tabellarische Darstellung einen exemplarischen Überblick der $\gamma\delta$ T-Zellzahlen in den untersuchten Organen Milz, Peritoneum, der Lamina Propria (LP) und dem intraepithelialen Kompartiment (IEL) des Kolons unter homöostatischen Bedingungen in der Maus geben (Tab. 4).

Tab. 4: Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellsubtypen

Tier Nr.	Totale Zellzahl	% Anteil an Lymphozyten	% Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen	Totale Zahl an $\gamma\delta$ T-Zellen	Mittelwert \pm SD	Organ
1	$7,74 \times 10^7$	72,90	1,83	$1,06 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$	Milz
2	$8,70 \times 10^7$	75,70	1,89	$1,25 \times 10^6$	\pm	
3	$5,90 \times 10^7$	83,10	2,07	$1,01 \times 10^6$	12662	
1	$5,84 \times 10^6$	30,80	1,63	29340	23185	PerC
2	$4,20 \times 10^6$	20,50	1,64	14104	\pm	
3	$5,76 \times 10^6$	22,20	2,04	26112	8028	
1	533200	15,00	4,89	527	515	LP
2	383856	5,66	10	646	\pm	
3	490590	3,79	5,62	374	136	
1	249320	17,10	19	6766	5914	IEL
2	534880	5,13	23,4	5688	\pm	
3	334560	13,00	18	5289	764	

3.2 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum

3.2.1 Homöostatisches Chemokinrezeptorprofil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen

3.2.1.1 Exemplarische *Gating*-Strategie von $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz und Peritoneum

Zur durchflusszytometrischen Analyse splenozytärer und peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen wurde in jedem Versuch die gleiche *Gating*-Strategie angewandt (Abb. 5). Dabei erfolgte über eine Dreifachfärbung B220⁻, CD3⁺ und $\gamma\delta$ TCR eine Identifizierung der $\gamma\delta$ T-Zellen. Zunächst wurden die Lymphozyten über die Lage im FSC/SSC definiert. In einem zweiten Schritt wurde über die Expression von B220 der Anteil der B220⁻ Zellen bestimmt. Diese wurden auf die Expression von CD3 und $\gamma\delta$ TCR untersucht. In einer anschließenden Histogramm-Darstellung wurde auf den B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen die Expression unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren x, in diesem Fall CCR6, bestimmt.

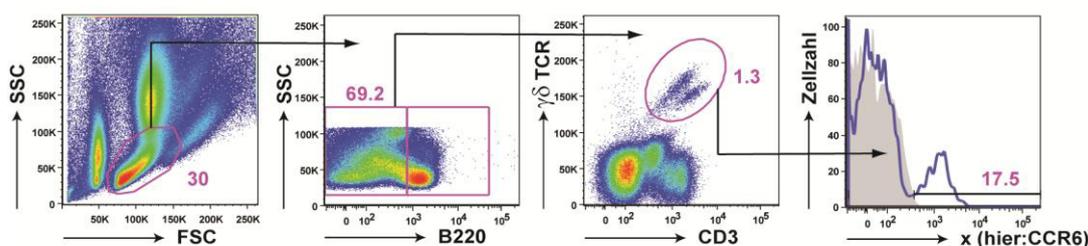


Abb. 5: Repräsentative *Gating*-Strategie peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in der *Dotplot* Darstellung

Bei allen nachfolgenden durchflusszytometrischen Analysen von $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz und Peritoneum wurde diese *Gating*-Strategie verwendet.

3.2.1.2 Rolle von CCR6 als funktioneller Marker und *Homing*rezeptor für $\gamma\delta$ T-Zellen

Neben Integrinen und Adhäsionsmolekülen spielt das Chemokin-Chemokinrezeptorsystem eine wichtige Rolle bei der kontinuierlichen Rezirkulation von Lymphozyten durch die unterschiedlichen Kompartimente des Körpers, in denen eine Immunantwort unter homöostatischen und auch unter entzündlichen Bedingungen stattfindet. Neben CCR9, CCR7, CXCR4 sowie CXCR5, die im Zusammenhang mit Lymphozytenintrasation- und extravasation in das Kolon bereits ausführlich beschrieben sind [30], wird in der Literatur auch CCR6 als *Homing*molekül in den Dünndarm für verschiedene Immunzellen erwähnt. So wurde der Chemokinrezeptor bereits für die gerichtete Migration von CD11c⁺ sowie CD11b⁺

dendritischen Zellen in die intestinale Mukosa des Dünndarms als *Homingrezeptor* identifiziert [97]. T_H17 -Zellen, die als Effektor T-Zellen regulatorische Funktionen bei der Kontrolle von Entzündungen übernehmen, zeigen ebenfalls eine CCR6-abhängige Migration in die Dünndarmmukosa [102].

Im Kontext von $\gamma\delta$ T-Zellen wird CCR6 als funktioneller Marker zur Unterscheidung zwischen $INF\gamma$ -produzierenden $CCR6^-$ $\gamma\delta$ T-Zellen und IL-17-produzierenden $CCR6^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben [26]. Folglich vereint CCR6 sowohl Aspekte der homöostatischen als auch inflammatorischen Chemokine und stellt zusätzlich einen funktionellen Marker bei der Unterscheidung Zytokin-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen dar.

Um herauszufinden, welche Bedeutung CCR6 für die Rezirkulation von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen haben könnte, wurde zunächst unter homöostatischen Bedingungen bei Wt-Tieren durchflusszytometrisch die Expression von CCR6 auf peritonealen und splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt (Abb. 6A). Im Peritoneum zeigte sich bei den konventionellen $\gamma\delta$ T-Zellen ein signifikant erhöhter Anteil an $CCR6^+$ $B220^-$ $CD3^+$ $\gamma\delta$ TCR^+ T-Zellen im Vergleich zur Milz (Abb. 6B). Bei Analysen von Wt-Tieren konnte im IEL- und LP-Kompartiment des Kolons auf $CD45.2^{high}$ $B220^-$ $CD3^+$ $\gamma\delta$ TCR^+ T-Zellen keine Expression von CCR6 nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass zirkulierende $CCR6^+$ $B220^-$ $CD3^+$ $\gamma\delta$ TCR^+ T-Zellen das Peritoneum verlassen, bei der Einwanderung in das Kolon die Expression von CCR6 jedoch herunter reguliert wird.

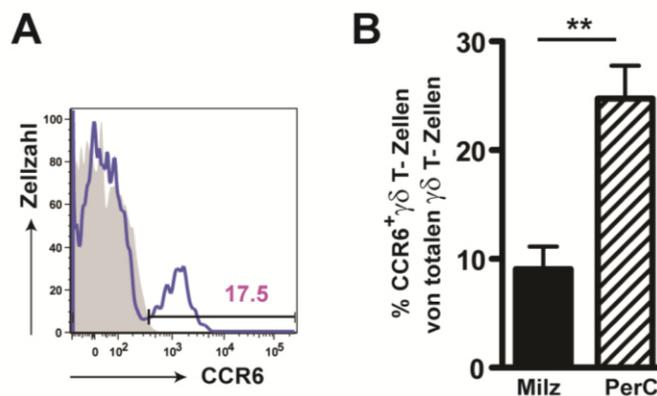


Abb. 6: Der Anteil $CCR6^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen ist im Peritoneum höher als in der Milz

(A) Repräsentative Histogramm-Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenexpression von CCR6 auf $B220^-$ $CD3^+$ $\gamma\delta$ TCR^+ T-Zellen im Peritoneum. Isotypkontrolle: grau schattierte Kurve. (B) Prozentualer Anteil der $CCR6^+$ $B220^-$ $CD3^+$ $\gamma\delta$ TCR^+ T-Zellen in der Milz (n = 6) und im Peritoneum (n = 6). Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM). ** p < 0,01; ungepaarter Mann-Whitney Test.

3.2.1.3 Rolle von CCR9 als mukosaler *Homingrezeptor*

CCR9 ist einer der wichtigsten Chemokinrezeptoren, die zur Lokalisation von zirkulierenden Immunzellen im Dünndarm beitragen. Sein Ligand CCL25 (TECK) wird konstitutiv von Dünndarmepithelzellen exprimiert [103]. In adoptiven Transferexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Migrationsverhalten von CCR9-defizienten IgA⁺ Plasmazellen in den Dünndarm im Vergleich zu Wt-Zellen beeinträchtigt ist [104]. Bei der Migration von CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ Thymozyten gegen einen CCL25-vermittelten Konzentrationsgradienten konnte CCR9 ebenfalls als vermittelnder Chemokinrezeptor identifiziert werden [105].

Gegenstand aktueller Forschung ist, welche Rolle die CCR9-CCL25-Interaktion bei der Regulation einer akuten Entzündung im Kolon im Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis hat. Es wurde postuliert, dass die CCL25-Expression nicht nur auf die Dünndarmmukosa restringiert ist, sondern auch im Kolonepithel CCL25 auf molekularer Ebene nachweisbar ist. Des Weiteren scheint eine CCR9-Defizienz zu einer Akkumulation plasmazytoider CD11b^{low} MHC II^{int/high} PDCA-1⁺ dendritischer Zellen (pDCs) im mesenterischen Lymphknoten zu führen und die Einwanderung von pDCs in die Kolonmukosa zu verhindern [106]. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung der CCR9-CCL25-Interaktion einen negativen Einfluss auf die Kontrolle inflammatorischer Immunantworten im Kolon hat.

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob CCR9 auch relevant für die Zirkulation und Migration von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon sein könnte. Hierzu wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Chemokinrezeptors auf $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum und im Thymus verglichen (Abb. 7A). Ungefähr die Hälfte aller CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ Thymozyten zeigte eine hohe MFI für CCR9. Auf peritonealen B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen war die MFI für CCR9 gering (Abb. 7B). Folglich scheint CCR9 keine Rolle bei der Wanderung peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen zu spielen.

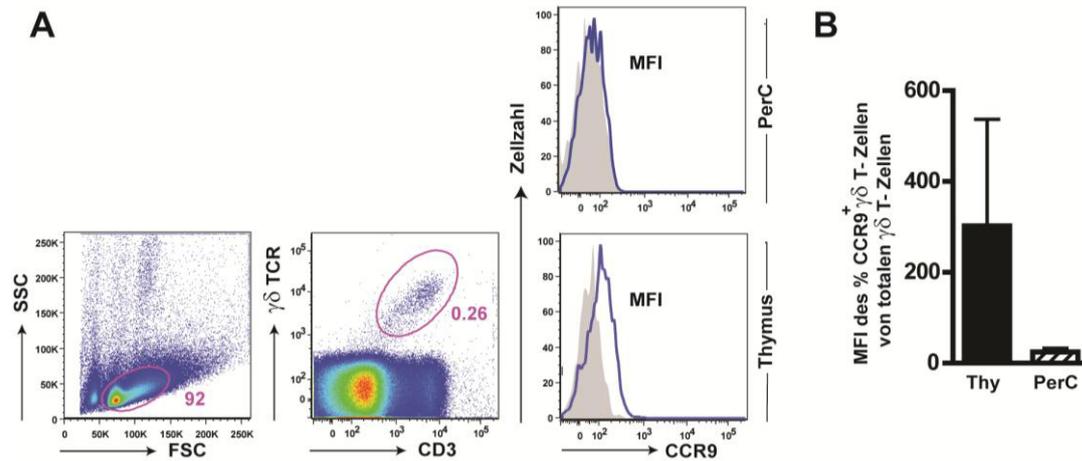


Abb. 7: Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren kein CCR9

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CCR9 auf $\gamma\delta$ T-Zellen im Thymus und im Peritoneum. Isotypkontrollen: grau schattierte Kurven. (B) Abgebildet ist die mittlere Fluoreszenzintensität der CCR9⁺ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen im Thymus (n = 2) und der CCR9⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen im Peritoneum (n = 5). Balken repräsentieren das arithmetische Mittel plus Standardfehler (SEM).

3.2.1.4 CCL28-vermittelte Chemotaxis peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen

Ein weiterer *Homing*faktor, der für die Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peritoneum in das Kolon verantwortlich sein könnte, ist der Chemokinrezeptor CCR10 mit seinem Ligand CCL28. Wie bereits gezeigt wurde, spielt dieser eine wesentliche Rolle bei der CCL28-vermittelten Chemotaxis von IgA⁺ zirkulierenden Plasmazellen und Plasmablasten in das Kolon [107, 108]. Auch die effiziente Einwanderung von thymischen V γ 3⁺ intraepithelialen T-Lymphozytenvorläuferzellen in die Epidermis der Haut stellt einen CCR10-abhängigen Prozess dar [109].

Zunächst wurde die Oberflächenexpression von CCR10 durchflusszytometrisch bestimmt. Im Kolon und Peritoneum konnte keine deutliche CCR10-Expression gezeigt werden, sodass mit der Durchführung des Chemotaxis-Assay zur Überprüfung der Funktionalität peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen gegen den Liganden CCL28 ein anderer experimenteller Zugang gewählt wurde.

Es wurden je 1×10^6 mononukleäre Zellen des Peritoneums hinsichtlich ihrer Migration gegen unterschiedliche Konzentrationen von CCL28 untersucht. Im Anschluss wurden die gewanderten Zellpopulationen durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von B220, CD3 und $\gamma\delta$ TCR charakterisiert (Abb. 8A).

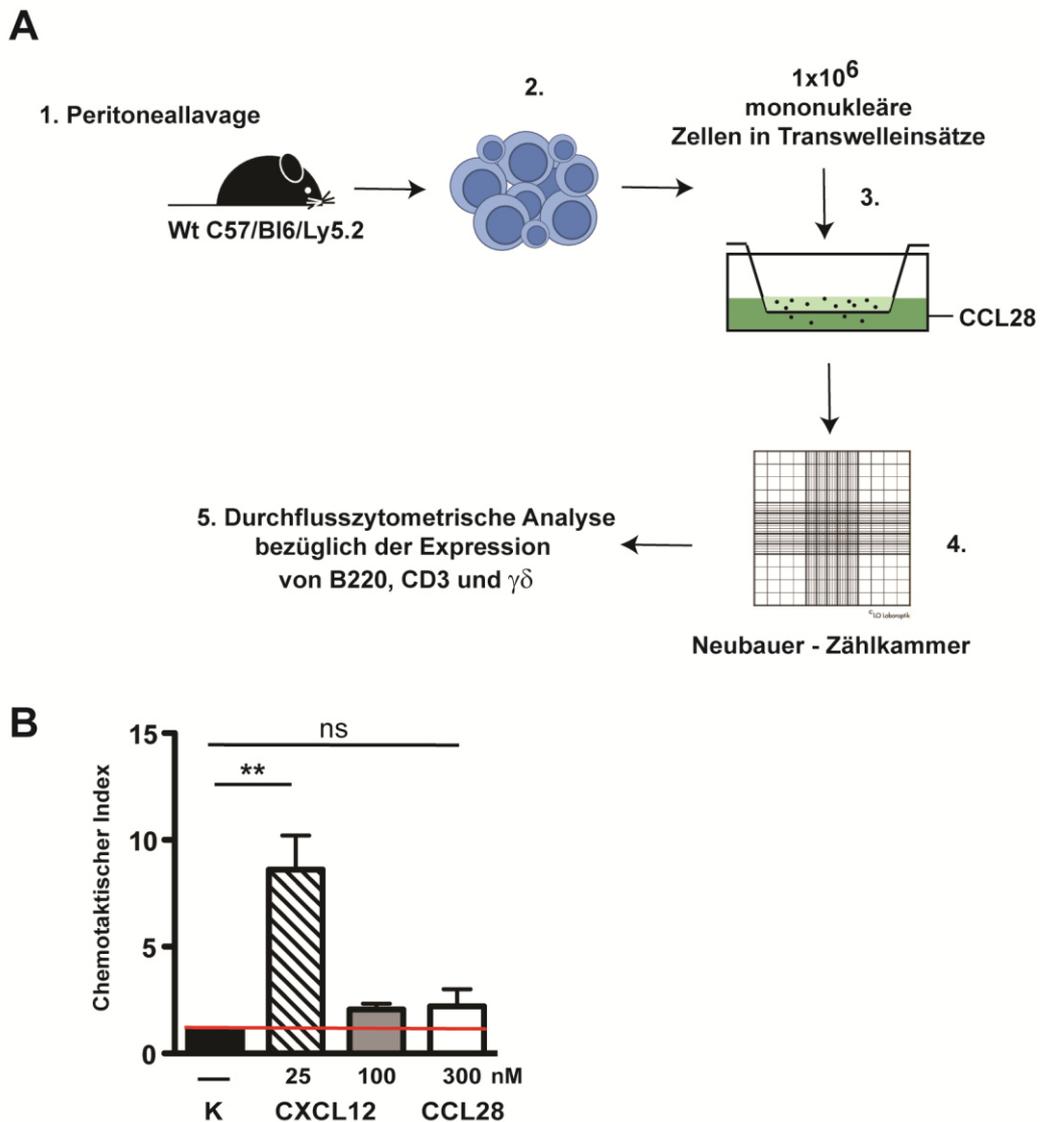


Abb. 8: Chemotaktisches Verhalten peritonealer Lymphozyten

(A) Schematische Darstellung des Versuchsansatzes zur Ermittlung des chemotaktischen Verhaltens peritonealer Lymphozyten. Bei 6-8 Wochen alten Wt-Mäusen wurde eine Peritoneallavage (1) durchgeführt und Einzelzellsuspensionen gewonnen (2). 1×10^6 der gewonnenen mononukleären Zellen wurden in die Transwell-Einsätze pipettiert (3). Diese wurden in die untere Kammer gehängt, in denen sich Chemokinlösung mit CCL28 in unterschiedlichen Konzentrationen befand. Nach 4 Std. Inkubationszeit wurde der Anteil migrierter Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (4) und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von B220, CD3 und $\gamma\delta$ TCR analysiert (5).

(B) Dargestellt ist der chemotaktische Index peritonealer Lymphozyten. Als Negativkontrolle wurde Migrationsmedium (K = Kontrolle) verwendet, als Positivkontrolle diente CXCL12. Balken sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. ** $p < 0,01$; ungepaarter Student's t-Test. (n.s., nicht signifikant).

Als Positivkontrolle wurde die Migration gegen CXCL12 untersucht, als Negativkontrolle diente Migrationsmedium. Es konnte gezeigt werden, dass peritoneale Lymphozyten eine leicht erhöhte Migration gegen CCL28 im Vergleich zum Migrationsmedium zeigen, welche statistisch nicht signifikant war. Das chemotaktische Verhalten gegenüber der Positivkontrolle CXCL12 war signifikant erhöht (Abb. 8B). Zusammenfassend konnte hier mit schwacher Responsivität peritonealer Lymphozyten gegen CCL28 über dem Hintergrund gezeigt werden, dass eine CCR10-gerichtete Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon nicht auszuschließen ist.

3.2.2 Expressionslevel von Integrinen und Adhäsionsmolekülen auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde bereits ein homöostatisches Chemokinrezeptorprofil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen erstellt. Neben den untersuchten Chemokinrezeptoren CCR6 und CCR9 sind aber auch Adhäsionsmoleküle und Integrine für das mukosale *Homing* von Lymphozyten in die nicht-organisierten lymphatischen Strukturen des Kolons von Bedeutung. Hierzu wurde eine Auswahl an fünf Molekülen getroffen, die potentiell relevant für die Einwanderung von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon sind.

Eine wesentliche Rolle bei der Erlangung eines Phänotyps, der mit Migration in das Kolon assoziiert wird, spielt das Integrin $\alpha4\beta7$. Sein Ligand MadCAM-1 wird konstitutiv vom intestinalen Gefäßepithel der LP exprimiert. Die $\alpha4\beta7$ -MadCAM-1-Interaktion vermittelt die primäre, reversible Adhäsion zirkulierender Lymphozyten ans Gefäßendothel sowie die feste Anbindung der Lymphozyten an die Gefäßwand im dritten Schritt des Vier-Stufen-Modells der Lymphozyten-Migration [30]. Neben $\alpha4\beta7$ -Integrin trägt auch LFA-1 zur Emigration in mukosales lymphatisches Gewebe bei [31]. Das Adhäsionsmolekül CD44 stellt nicht nur einen Marker für Effektor-Gedächtnis T-Helferzellen [110] und Aktivierungsmarker dar [111], sondern wirkt auch subsidiär bei der festen Adhäsion von Lymphozyten ans Gefäßendothel. Hier formt es mit $\alpha4\beta1$ -Integrin (CD49d/CD29) einen bimolekularen Komplex, der die feste Bindung an den Liganden VCAM-1 verstärkt [30].

Auf den getesteten B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen des Peritoneums von Wt-Mäusen unter homöostatischen Bedingungen konnte mittels Durchflusszytometrie insgesamt eine hohe Expression an CD44, CD29, LFA-1, CD49d und $\beta7$ -Integrin detektiert werden (Abb. 9).

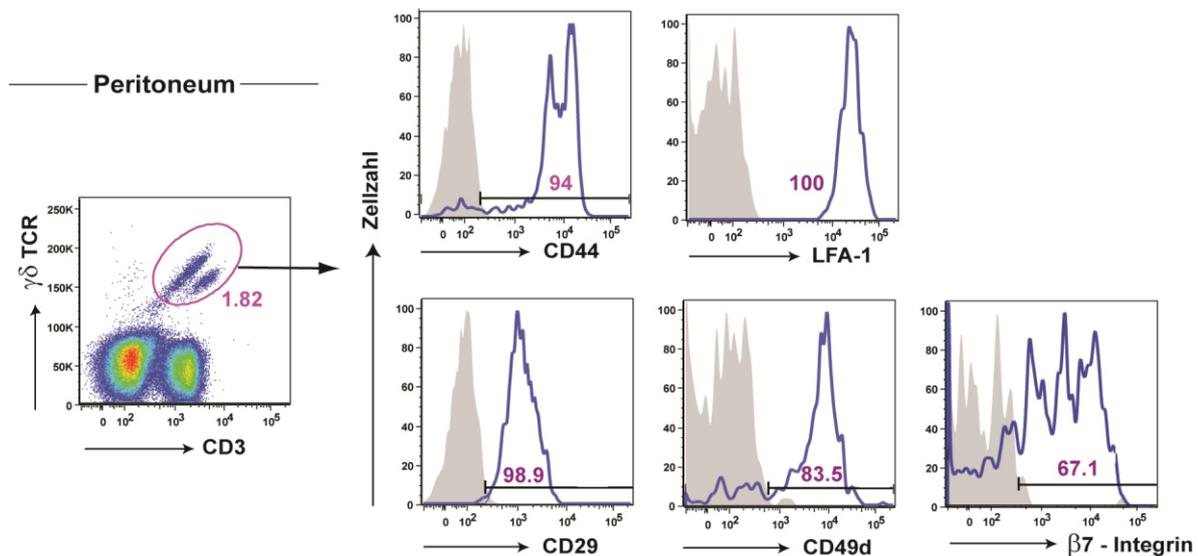


Abb. 9: Adhäsionsmoleküle und Integrine auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen in der Dotplot-Darstellung

Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD44, CD29, LFA-1, CD49d und $\beta 7$ -Integrin auf $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen im Peritoneum unter homöostatischen Bedingungen. Isotypkontrollen: grau schattierte Kurven.

Beim Vergleich der Expressionslevel von $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen in Milz und Peritoneum konnte für LFA-1 und CD44 eine signifikant erhöhte Expression auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen ermittelt werden. Dies war auch unter entzündlichen Bedingungen nach DSS-induzierter Kolitis der Fall. Für das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin (CD49d/ $\beta 7$ -Integrin) konnte keine weitere Hochregulation im Peritoneum festgestellt werden. Die Expressionen von CD49d und $\beta 7$ -Integrin bei Wt-Tieren unter homöostatischen Bedingungen waren auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zur Milz signifikant erniedrigt. Beim Integrin CD29 zeigte sich unter entzündlichen und homöostatischen Bedingungen kein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der Expressionslevel in Milz und Peritoneum (Abb. 10).

Zusammenfassend demonstrierten die durchflusszytometrischen Untersuchungen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums mit der Expression von LFA-1 und CD44 einen Phänotyp zeigen, der sie zur Migration in das entzündete Kolon prädisponiert. Die Integrine $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$ sind im Peritoneum im naiven Zustand bereits hoch exprimiert. Unter entzündlichen Bedingungen findet keine weitere Hochregulation statt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Integrine eine wesentliche Rolle beim Rezirkulationsprozess peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen spielen.

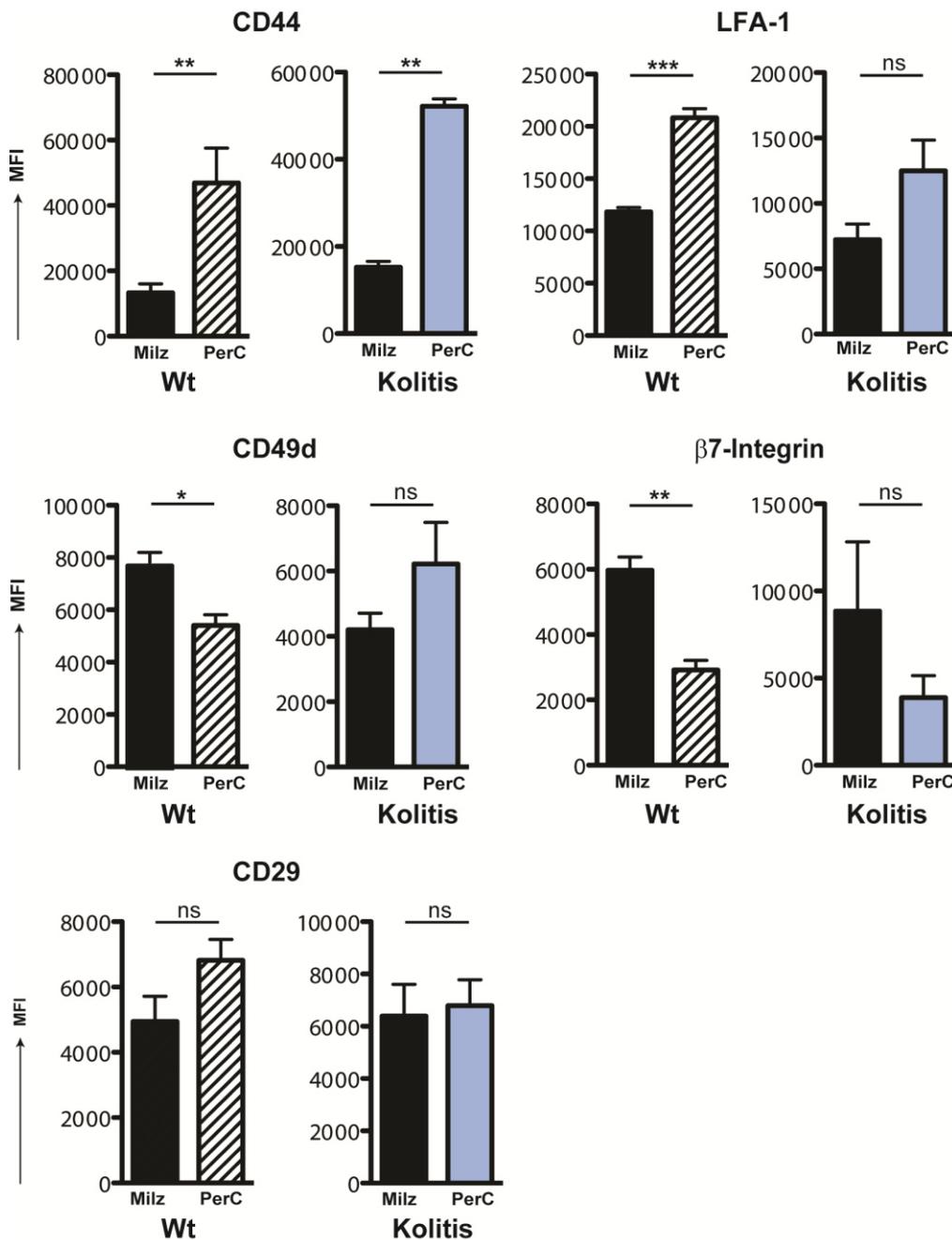


Abb. 10: Vergleich der Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen und Integrinen splenozytärer und peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen

Vergleich der Expressionslevel von Integrinen und Adhäsionsmolekülen auf $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz und Peritoneum in Wt-Mäusen unter homöostatischen Bedingungen mit Mäusen, bei denen durch 4-5 tägige DSS-Gabe eine Kolitis induziert wurde. Die MFI als Maß der Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle und Integrine auf $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen in Milz ($n = 4-7$) und Peritoneum ($n = 4-8$) unter homöostatischen Bedingungen (Milz: schwarz, PerC: gestreift) sind den MFI der $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen von Milz ($n = 3-5$) und Peritoneum ($n = 3-5$) unter inflammatorischen Bedingungen (Milz: schwarz, PerC: blau) gegenübergestellt. Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ungepaarter Mann-Whitney Test (n.s., nicht signifikant).

3.2.3 Reifungs- und Aktivierungsstatus peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen

Nach der Ermittlung der Expressionslevel von Chemokinrezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen und Integrinen auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen wurde der Fragestellung nachgegangen, ob peritoneale im Vergleich zu splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp besitzen. Dieser könnte einerseits die Hypothese unterstützen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums über Migration eine lokale Immunantwort im entzündeten Kolon fördern. Andererseits könnte eine Aktivierung im Peritoneum auch lokal Differenzierungsprozesse der $\gamma\delta$ T-Zellen in Zytokinproduzierende Effektorzellen anregen, welche intraperitoneal verbleiben und ihre Effektorfunktionen von der Seite des Peritoneums ausüben. Es wurden durchflusszytometrisch die Expressionslevel der charakteristischen Aktivierungsmarker CD69, CD25 und CD62L auf $\gamma\delta$ T-Zellen aus Milz und Peritoneum verglichen.

Die Analyse peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen ergab zunächst, dass sowohl unter homöostatischen als auch inflammatorischen Bedingungen alle peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen eine hohe Expression des Aktivierungsmarkers CD44 zeigen (siehe Abb. 10, Kapitel 3.2.2).

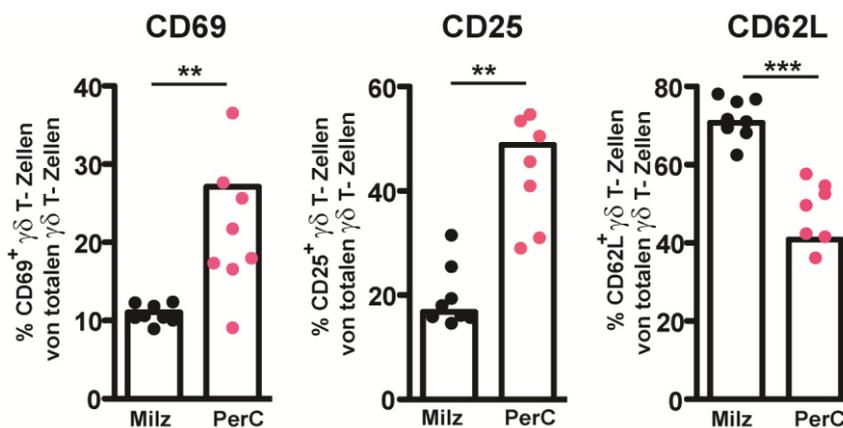


Abb. 11: Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp

Durchflusszytometrische Bestimmung der Aktivierungsmarker CD69, CD25 und CD62L auf $\gamma\delta$ T-Zellen von 6-8 Wochen alten Wt-Mäusen. Quantifizierung des prozentualen Anteils der aktivierten CD69⁺, CD25⁺ oder CD62L⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen in der Milz (n = 7-8) und im Peritoneum (n = 8). Balken repräsentieren das arithmetische Mittel und Standardfehler (SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Tiere. ** p < 0,01, *** p < 0,001; ungepaarter Mann-Whitney Test.

Bei annähernd einem Drittel der B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen im Peritoneum konnte eine Expression von CD69 detektiert werden, welche signifikant erhöht im Vergleich zu splenozytären B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen war. Das Glykoprotein CD69 gilt als einer der frühesten charakteristischen Aktivierungsmarker von Lymphozyten [112]. Mehr als die Hälfte

der peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen trug CD25 auf der Oberfläche, ein Marker, der bei der zeitlichen Klassifikation der Aktivierungsmarker als mittlerer Aktivierungsmarker eingestuft wird und stabil aktivierte Effektorzellen charakterisiert. Auch hier waren die Expressionslevel im Vergleich zu $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Milz signifikant erhöht. Bezüglich der Expression von CD62L (L-Selektin), welches den Eintritt von Lymphozyten in sekundär lymphatische Organe über HEVs vermittelt [113], war die Expression auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen erniedrigt, auf splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen erwartungsgemäß signifikant erhöht (Abb. 11).

Zusammengefasst ergab die durchflusszytometrische Analyse, dass eine Subpopulation von ca. 30-50 % peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp mit Effektor-Gedächtnis T-Helfer-Zellfunktion aufweist.

3.2.4 Zytokinprofil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen

3.2.4.1 Expression von IL-17

Nachdem die phänotypischen Merkmale von splenozytären und peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen verglichen wurden, sollte in einem nächsten Schritt der Fokus auf die funktionellen Charakteristika der $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums gelegt werden. Hierzu wurde über die durchflusszytometrische Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins IL-17A (nachfolgend IL-17) ein Zytokinprofil peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen erstellt.

Dem proinflammatorischen Zytokin IL-17 wird eine wesentliche Rolle bei der Regulation der angeborenen Immunantwort zugeschrieben. Hauptproduzenten von IL-17 im Rahmen der erworbenen Immunität sind die $CD4^+$ T_H17 -Zellen [16, 114, 115]. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind $\gamma\delta$ T-Zellen neben *Lymphoid tissue inducer* (LTi)-Zellen, Neutrophilen oder invarianten Natürlichen-Killer-Zellen Hauptproduzenten von IL-17 während autoimmuner Prozesse und Infektionskrankheiten [74]. IL-17 als Zytokin führt nicht nur zur vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen, sondern hat auch antibakterielle sowie antimikrobielle Effektorfunktionen und erhöht die epitheliale Integrität der mukosalen Barriere über die Stimulation von *tight-junctions* [116]. Bei vorangegangenen Untersuchungen von $\gamma\delta$ TCR^+ Thymozyten konnte gezeigt werden, dass anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wie CCR6 und CD27 zwischen IL-17- und $INF\gamma$ -produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen unterschieden werden kann und diese den Thymus bereits vorprogrammiert hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen verlassen [74].

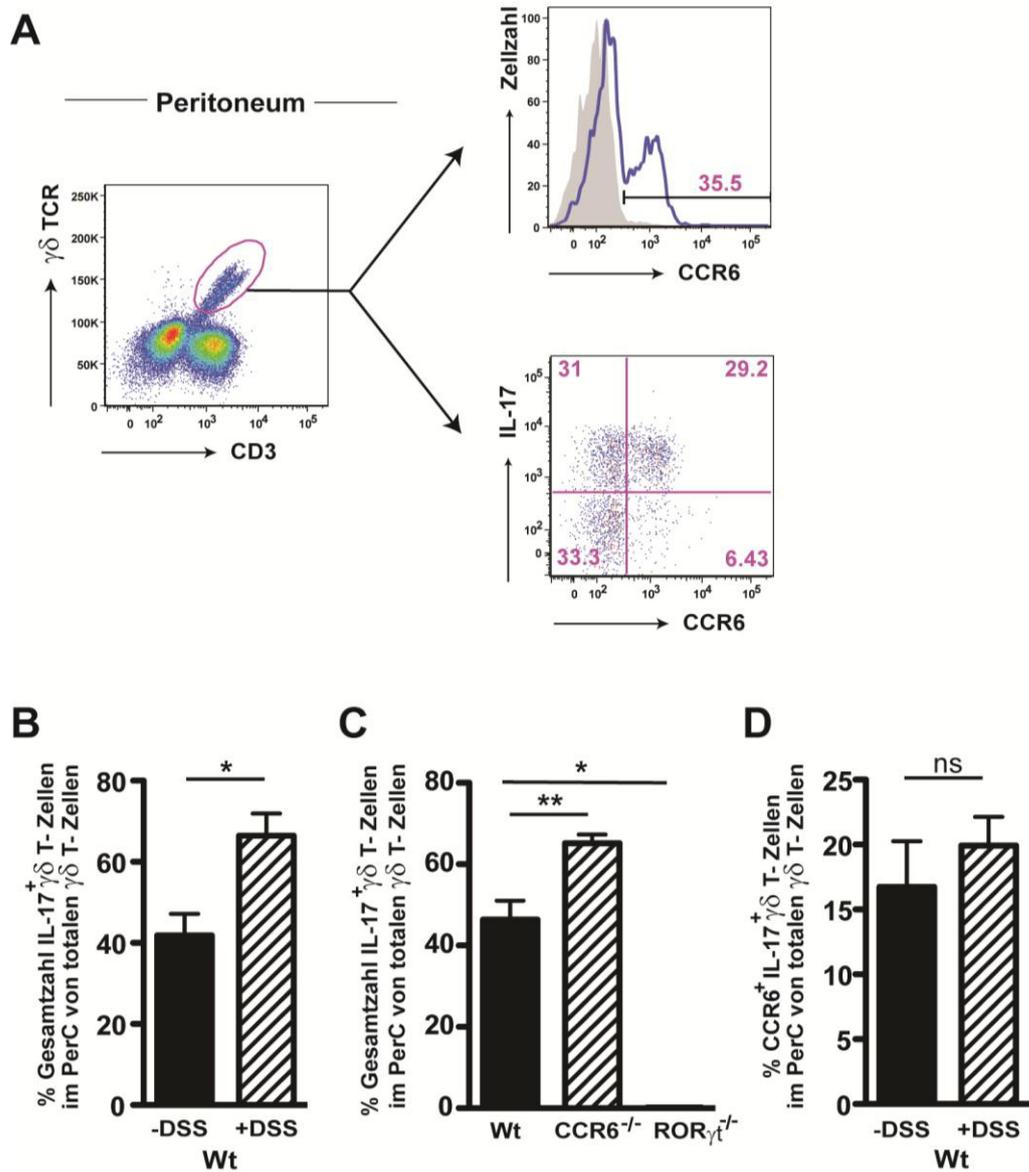


Abb. 12: Quantifizierung der IL-17 Produktion von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum von Wt, ROR γ t^{-/-}, CCR6^{-/-} Mäusen sowie bei Wt-Tieren mit DSS-induzierter Kolitis

(A) Repräsentative *Dotplots* der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenexpression von CCR6 und der IL-17-Produktion peritonealer B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen in 6-8 Wochen alten Wt-Mäusen, die zuvor *in vitro* mit Brefeldin/Ionomycin/PMA stimuliert wurden. Die Zahlen in den Quadranten geben jeweils den prozentualen Anteil an. Isotypkontrolle: grau schattierte Kurve. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil IL-17-sekretierender B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen von totalen $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum von naiven Wt-Mäusen (n = 5, -DSS) und Tieren, bei denen durch 4-5 tägige DSS-Gabe im Trinkwasser eine Kolitis hervorgerufen wurde (n = 5, +DSS). (C) Vergleich des prozentualen Anteils IL-17-produzierender peritonealer B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen in Wt (n = 7), CCR6^{-/-} (n = 7) und ROR γ t^{-/-} (n = 3) Mäusen. (D) Quantitative Bestimmung des prozentualen Anteils CCR6⁺ IL-17⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR T-Zellen im Peritoneum von Wt (n = 7, -DSS) und Kolitis (n = 5, +DSS) Mäusen. Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM). * p < 0,05, ** p < 0,01; ungepaarter Mann-Whitney Test (n.s., nicht signifikant).

Für die intrazelluläre Färbung von IL-17 wurden peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zunächst vier Stunden mit einem Cocktail aus PMA, Ionomycin und Brefeldin A *in vitro* stimuliert. Im Anschluss wurde in der Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression von CCR6 auf $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen detektiert und die Koexpression mit IL-17 überprüft (Abb. 12A). Im Peritoneum von Wt-Mäusen, bei denen durch DSS-Gabe eine Kolitis induziert wurde, produzierten weit mehr als die Hälfte aller $\gamma\delta$ T-Zellen IL-17. Der Anteil $IL-17^+ B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen war signifikant erhöht im Vergleich zu naiven Wt-Tieren (Abb. 12B). Beim Vergleich der IL-17-Level von Wt-Tieren mit $CCR6^{-/-}$ Mäusen zeigten letztere überraschenderweise einen signifikant erhöhten Anteil an $IL-17^+ B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen. In $ROR\gamma t^{-/-}$ Mäusen, denen der Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Differenzierung von IL-17-produzierenden Zellen fehlt, konnten keine IL-17-sekretierenden $\gamma\delta$ T-Zellen detektiert werden (Abb. 12C). Lediglich eine Subpopulation von 15-20 % $IL-17^+ B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen am Anteil aller IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum von naiven Mäusen und Tieren mit einer Entzündung im Kolon exprimiert den Chemokinrezeptor CCR6. Dieser gilt als charakteristischer Marker IL-17-produzierender Zellen (Abb. 12D).

Zusammengefasst ergeben die vorliegenden Daten, dass unter einer akuten Entzündung im Kolon der Anteil IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum signifikant expandiert. Interessanterweise war in $CCR6^{-/-}$ Mäusen, denen CCR6 als funktioneller Rezeptor fehlt, der Anteil IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu Wt-Mäusen signifikant erhöht. Man kann daher eine CCR6-Expression funktionell nicht mit einer IL-17-Expression korrelieren. Die CCR6-Expression stellt somit keine Voraussetzung für $\gamma\delta$ T-Zellen dar, um IL-17 zu produzieren. Der Oberflächenrezeptor ist lediglich bei ca. 20 % der peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Zytokinproduktion assoziiert. Folglich ist der größere Teil der IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum CCR6 negativ.

3.2.4.2 ROR γt abhängige Differenzierung von IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen

In der Literatur wird ROR γt als Mastertranskriptionsfaktor für die Differenzierung und Polarisierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen in T_H17 Zellen beschrieben [11]. Auch $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen intrathymisch bereits eine hohe Expression des Gens *RORc*, welches für den Transkriptionsfaktor ROR γt kodiert [67, 116]. Somit wurde vermutet, dass ROR γt auch Haupttranskriptionsfaktor bei der Differenzierung peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in IL-17-Produzenten ist.

Zur Überprüfung wurde bei IL-17-produzierenden B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen des Peritoneums in naiven Wt-Mäusen und ROR γ t^{-/-} Mäusen nach *in vitro* Restimulation eine intrazelluläre Färbung mit anti-ROR γ t- sowie anti-IL-17-Antikörpern durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung (Abb. 13).

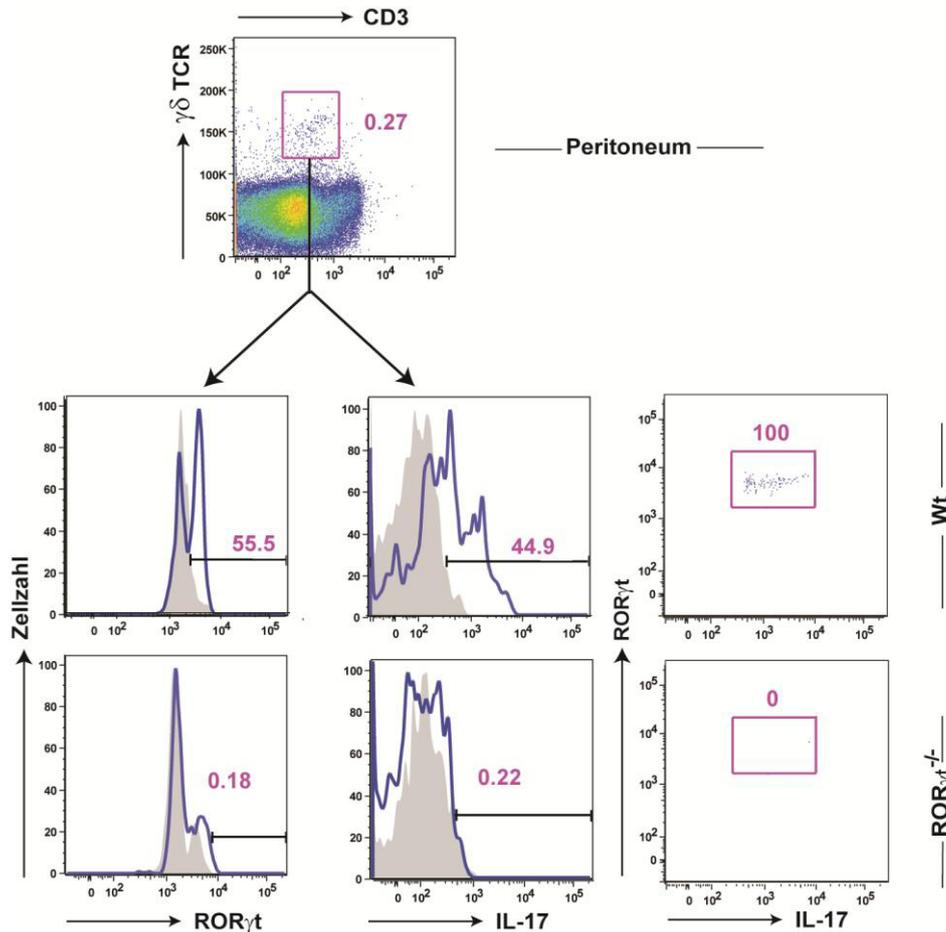


Abb. 13: Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen von Wt und ROR γ t^{-/-} Mäusen in der *Dotplot*-Darstellung

Repräsentative durchflusszytometrische Analysen des Peritoneums von Wt (oberste *Dotplot*-Darstellung) und ROR γ t^{-/-} Mäusen zur Untersuchung der Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t in IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen. Isotypkontrollen: grau schattierte Kurven.

In naiven Wt-Tieren exprimierten alle IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen ROR γ t. Der Anteil ROR γ t⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen von naiven Wt-Tieren war im Vergleich zu ROR γ t^{-/-} Mäusen, in denen keine Expression von ROR γ t detektiert werden konnte, signifikant erhöht (Abb. 14A). In den Wt-Mäusen sezernierte ca. die Hälfte aller peritonealen B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen IL-17, was ungefähr dem Anteil ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen entspricht. In ROR γ t^{-/-} Mäusen wurde keine IL-17-Produktion ermittelt (Abb. 14B).

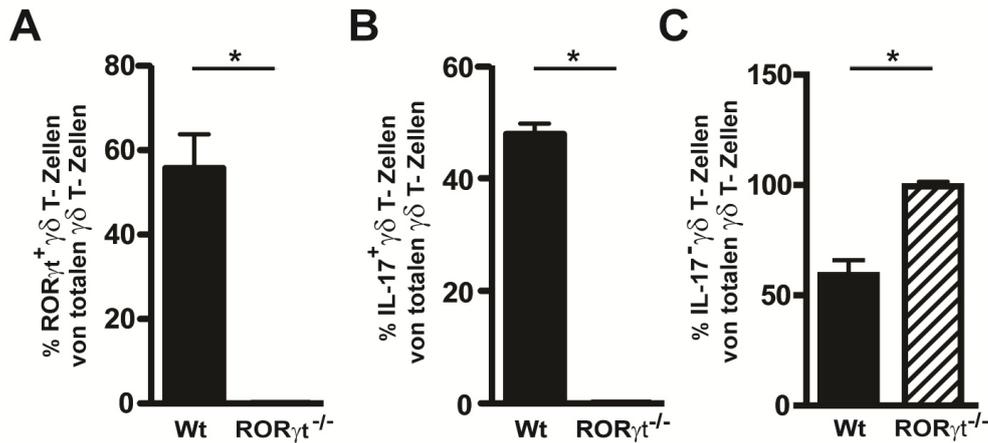


Abb. 14: Peritoneale IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t

(A) Bestimmung des Anteils ROR γ t-exprimierender (n = 4) und (B) IL-17-produzierender (n = 3-4) sowie (C) IL17⁻ (n = 3-4) B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen in Wt und ROR γ t^{-/-} Mäusen. Balken repräsentieren arithmetisches Mittel mit Standardfehler (SEM). * p < 0,05; ungepaarter Mann-Whitney Test.

Im Peritoneum von Wt-Mäusen waren ca. 50-70 % IL17⁻ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen, in ROR γ t^{-/-} Mäusen hingegen war der Anteil mit ca. 100 % IL17⁻ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen erwartungsgemäß signifikant erhöht (Abb. 14C). Beim Vergleich der totalen $\gamma\delta$ T-Zellzahlen im Peritoneum von Wt und ROR γ t^{-/-} Mäusen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (unveröffentlichte Daten). Zusammenfassend konnte hier bestätigt werden, dass der Transkriptionsfaktor ROR γ t essentiell für die Entwicklung IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum ist.

3.2.5 Unterschiede IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz, Peritoneum und Kolon

3.2.5.1 CD8 α als T-Zell-Korezeptor

In der Maus konnte durchflusszytometrisch bereits eine heterogene Verteilung der $\gamma\delta$ T-Zellen in der LP und im IEL des Dünndarm und des Kolons aufgezeigt werden. Von den LPL exprimieren lediglich ca. 10-20 % den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor, bei den IELs hingegen sind die $\gamma\delta$ T-Zellen mit bis zu 30 % häufiger vertreten [117, 118]. Im humanen Darm besteht ein Drittel der IELs aus $\gamma\delta$ T-Zellen, in der LP sind es weniger als 5 %. Interessant ist auch die Komposition der V γ - und V δ -Ketten in Abhängigkeit vom jeweiligen Epithel. Im murinen Kolon dominiert im IEL die V γ 7-Kette in Kombination mit variablen δ -Ketten, beim Menschen ist die V γ 8/V δ 1-Kette auf den Hauptteil aller IELs exprimiert [119]. Zur Unterscheidung von $\gamma\delta$ T-Zellen in der LP und IEL

des Kolons kann auch die Oberflächenexpression des T-Zell-Korezeptors CD8 α herangezogen. $\gamma\delta$ T-Zellen des IEL sind positiv hinsichtlich der Expression von CD8 α , die der LP negativ [118]. Funktionell werden die $\gamma\delta$ T-Zellen der LP als IL-17-Produzenten definiert, im Gegensatz zu denen des IEL, die IL-17 $^{-}$ sind [11].

Bei den adoptiven Zelltransfersversuchen mit isolierten Wt-Splenozyten (siehe Kap. 3.4.1) konnte gezeigt werden, dass nach intraperitonealer Injektion die transferierten $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl in der LP als auch im IEL des entzündeten Kolons nachweisbar sind. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die unterschiedlichen phänotypischen Charakteristika der $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen im Kolon bereits von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen reflektiert werden.

Dazu wurde durchflusszytometrisch der Anteil CD8 α^{+} B220 $^{-}$ CD3 $^{+}$ $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ T-Zellen in der Milz, im Peritoneum, in der LP und im IEL bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde eine Doppelfärbung für CD8 α und IL-17 durchgeführt (Abb. 15, repräsentative *Dotplots* der LP).

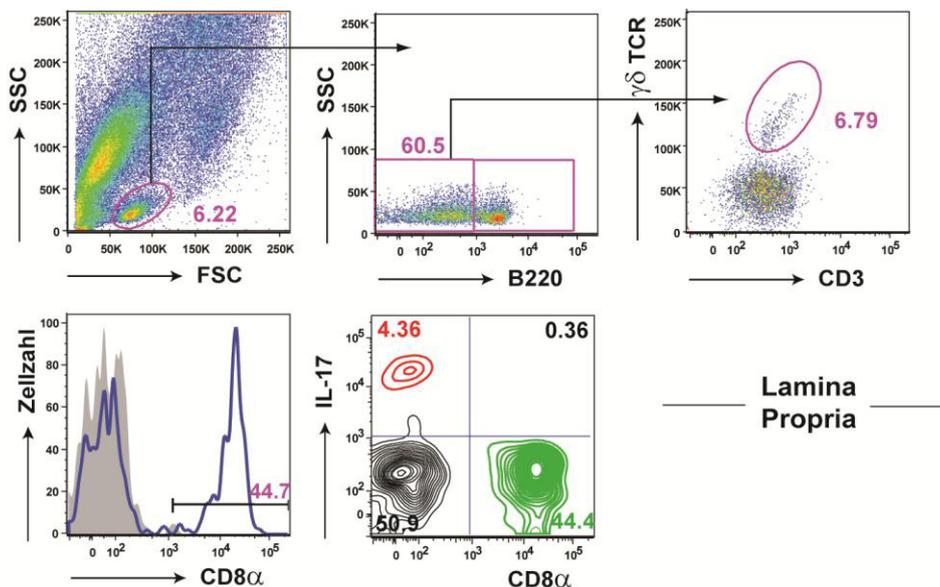


Abb. 15: Repräsentative Gating-Strategie der CD8 α -Expression IL-17-sekretierender $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon in der Dotplot-Darstellung

Charakteristische durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenexpression des T-Zell-Korezeptors CD8 α und der IL-17 Produktion von $\gamma\delta$ T-Zellen in der LP des Kolons von Wt-Mäusen, die zuvor *in vitro* mit Brefeldin/Ionomycin/PMA stimuliert wurden. Zunächst wurde die Expression von CD8 α auf B220 $^{-}$ CD3 $^{+}$ $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ T-Zellen überprüft. In der letzten Abbildung ist die intrazelluläre IL-17 Produktion der Expression des Oberflächenrezeptors CD8 α gegenübergestellt. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil für den jeweiligen Quadranten an. Isotypkontrolle: grau schattierte Kurve.

Von den B220 $^{-}$ CD3 $^{+}$ $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ T-Zellen in der Milz exprimierten ca. 50 % CD8 α . Der Anteil splenozytärer CD8 α^{+} B220 $^{-}$ CD3 $^{+}$ $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ T-Zellen war signifikant erhöht gegenüber den

peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen, die kein $CD8\alpha$ exprimierten. Im Kolon zeigten etwa 40-50 % der $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen in der LP und im IEL eine $CD8\alpha$ -Expression (Abb. 16A). Beim Vergleich der IL-17-Produktion war der Anteil $IL-17^+ B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen im Peritoneum signifikant höher als in der Milz, wo nur ca. 5 % der $\gamma\delta$ T-Zellen IL-17 nach *in vitro* Restimulation sezernierten (Abb. 16B). Im Kolon konnte bestätigt werden, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen der LP im Gegensatz zu $\gamma\delta$ T-Zellen des IEL IL-17 produzieren [11]. Der Anteil $IL-17^+ B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen war mit ca. 4 % in der LP signifikant erhöht (Abb. 16C). IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen waren in allen untersuchten Organen $CD8\alpha^-$. Zusammengefasst zeigte die Untersuchung entgegen der bisher publizierten Daten [29, 118], dass ca. 40 % der $\gamma\delta$ T-Zellen in beiden Kompartimenten des Kolons, im IEL und in der LP, $CD8\alpha$ exprimieren. Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten keine $CD8\alpha$ -Expression.

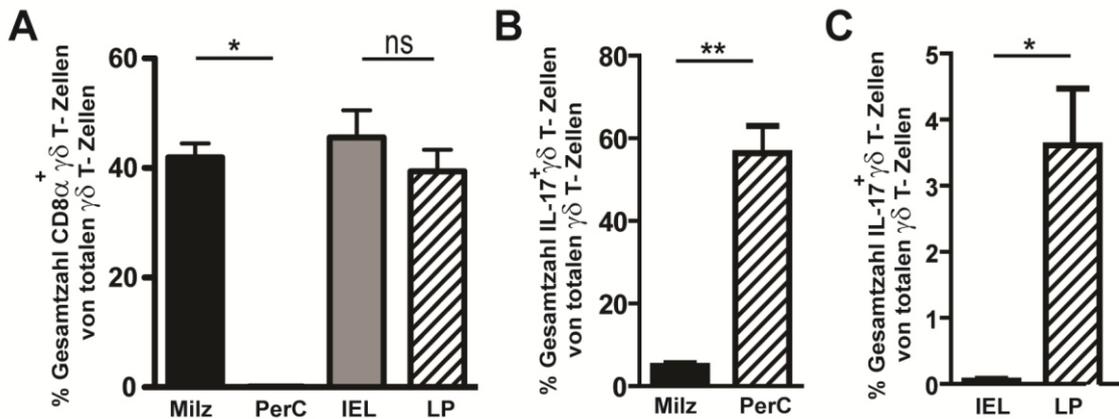


Abb. 16: Untersuchung der $CD8\alpha$ -Expression IL-17-sekretierender $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz, Peritoneum und Kolon

(A) Prozentualer Anteil $CD8\alpha^+ B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen in Milz (n = 5), Peritoneum (n = 5), dem IEL (n = 5) und der LP (n = 5) des Kolons. (B) Anteil IL-17-produzierender $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen in Milz (n = 5) und Peritoneum (n = 5). (C) Quantitative Auswertung des Anteils IL-17-produzierender $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen im IEL (n = 5) und in der LP (n = 5). Balken repräsentieren das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM). * p < 0,05, ** p < 0,01; ungepaarter Mann-Whitney Test (n.s., nicht signifikant).

3.2.5.2 CD27 als Oberflächenmarker

Neben CCR6 wird auch der Oberflächenrezeptor CD27, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, als Marker zur Unterscheidung von IL-17- versus $INF\gamma$ -produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen in der Literatur beschrieben. Demnach legt CD27 als Determinante bereits im Thymus fest, ob sich embryonale $\gamma\delta$ T-Zellen in $CD27^- CCR6^+ IL-17^+$ oder $CD27^+ CCR6^- INF\gamma^+$ -Produzenten

entwickeln [27, 120]. Es wird auch darauf hingewiesen, dass bereits im Thymus verschiedene transkriptionelle Programme die Expression von *Homingrezeptoren* und die Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Peripherie festlegen [121]. Der im Thymus erworbene Phänotyp scheint in der Peripherie stabil zu bleiben [27]. In diesem Zusammenhang ergab sich die Fragestellung, ob auch CD27 als Unterscheidungsmarker für peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen herangezogen werden kann. Dazu wurden durchflusszytometrisch die Expressionen von CD27 und CD8 α von peritonealen und splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen verglichen. In der Milz exprimierten nahezu alle B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen CD27. Der Anteil CD27⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen war signifikant erhöht im Vergleich zum Peritoneum, wo nur auf ca. 40 % der $\gamma\delta$ T-Zellen CD27 detektiert werden konnte (Abb. 17A). In der Milz konnte auf ca. 30-40 % der B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen eine CD8 α -Expression nachgewiesen werden. Wie schon in Abb. 16A gezeigt, exprimieren peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen kein CD8 α (Abb. 16A und Abb. 17B).

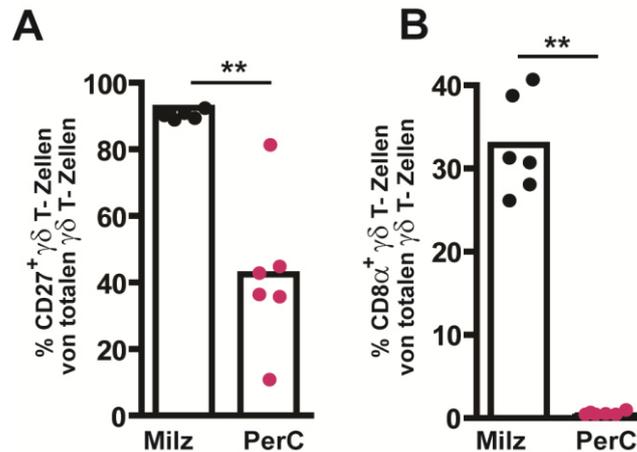


Abb. 17: In der Milz ist der Anteil CD27 und CD8 α -exprimierender $\gamma\delta$ T-Zellen höher als im Peritoneum

(A) Quantitative Bestimmung des Anteils CD27⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen und (B) CD8 α ⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen in Milz (n = 6) und Peritoneum (n = 6). Balken repräsentieren arithmetisches Mittel mit Standardfehler (SEM). ** p < 0,01; ungepaarter Mann-Whitney Test.

Zusammengefasst scheint CD27 im Gegensatz zu CD8 α ein einzigartiger Differenzierungsmarker bei der Unterscheidung Zytokin-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen, den IL-17- oder INF γ -Produzenten, im Peritoneum zu sein. Somit kann ein wechselseitiger Bezug zwischen CD27-Expression und IL-17-Produktion hergestellt werden.

3.2.6 Molekulare Signatur splenozytärer und peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen

3.2.6.1 RNA-Isolation aus $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz und Peritoneum

In einem weiteren Schritt sollte auf molekularer Ebene untersucht werden, ob sich die peritonealen von den splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen hinsichtlich der Expression bestimmter Zytokine und relevanter Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Dafür wurde die RNA aus aufgereinigten $B220^- CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen des Peritoneums und $CD3^+ \gamma\delta TCR^+$ T-Zellen der Milz isoliert und im Anschluss die Expressionslevel unterschiedlicher Genfunktionen mit dem *Mouse T Cell Differentiation Array* (SA Bioscience) analysiert. Die schematische Übersicht des Versuchsablaufes ist in Abb. 18 dargestellt.

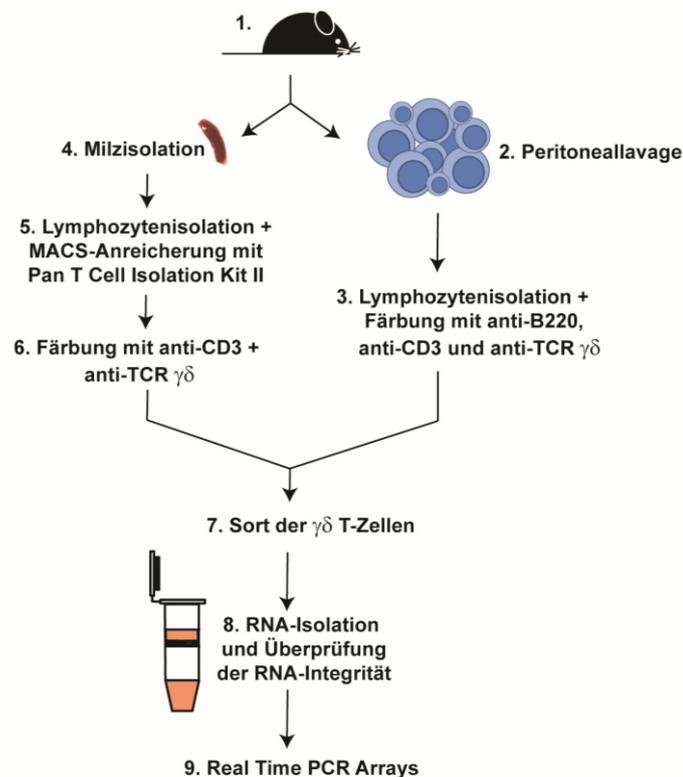


Abb. 18: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur RNA-Isolation aus splenozytären und peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen

Bei 6-8 Wochen alten Wt-Mäusen (1) wurde eine Peritoneallavage durchgeführt (2) und die gepoolten, isolierten Lymphozyten mit anti-B220, anti-CD3 und anti-TCR $\gamma\delta$ gefärbt (3). Nach Durchführung der Peritoneallavage wurde den Mäusen die Milz entnommen (4) und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die isolierten Splenozyten wurden zur Anreicherung von $CD3^+$ T-Zellen mithilfe des MACS Pan T Cell Isolation Kit II (Milteny Biotec) negativ selektioniert (5) und im Anschluss mit anti-CD3 und anti-TCR $\gamma\delta$ gefärbt (6). Die Zellen wurden im nächsten Schritt am FACS Aria (Becton Dickinson) gesortet (7), wobei circa 40.000 bis 80.000 peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen und 150.000 bis 200.000 splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen gewonnen wurden. Mithilfe der RNA Isolation Kits von Qiagen wurde die RNA isoliert (8) und mit dem Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent) auf ihre Integrität überprüft sowie die Konzentration bestimmt (8). Zur Untersuchung der Genexpressionslevel wurden *Mouse T Cell Differentiation Arrays* (SA Bioscience) durchgeführt (9).

3.2.6.2 Unterschiede der Genexpressionslevel von splenozytären und peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Genarray-Analysen zeigten mit ROR α und ROR γ auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen zunächst hochregulierte Genfunktionen, die neben den Zytokinen IL-21, TGF- β und IL-6 [122] essentiell bei der Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in proinflammatorische T_H17-Zellen sind. Die Expression der Transkriptionsfaktoren war auf $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums um das Drei- bis Vierfache im Vergleich zur Milz hochreguliert (Abb. 19, obere Reihe). Im Jahr 2006 wurde von Ivanov und Kollegen [11] ROR γ t als erster Mastertranskriptionsfaktor für die Differenzierung von T_H17-Zellen beschrieben, die wesentlich zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Kollagen-induzierter Arthritis oder Multipler Sklerose beitragen. Außerdem wurde erstmals postuliert, dass ROR γ t zukünftig als therapeutisches Target bei der Behandlung dieser entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden könnte [11, 123]. ROR α wurde dann im Jahr 2008 als ein weiterer relevanter Transkriptionsfaktor des T_H17-Differenzierungsprozesses identifiziert [12].

Socs-Proteine, *Suppressors of cytokine signaling proteins*, regulieren über den JAK-STAT-Signalweg unter anderem T-Zellentwicklung, Lymphozytenmigration und entzündliche Prozesse [124]. SOCS1, dessen Expression auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen vierfach hoch reguliert war im Vergleich zu splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen, übt einen inhibitorischen Effekt auf STAT1 (*STAT-signal transducers and activators of transcription*) und STAT6 aus [124, 125]. In SOCS1-defizienten T-Zellen ist zudem der T_H17-Differenzierungsprozess supprimiert [126]. Die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT6 waren auf $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums herunterreguliert, was direkt mit der SOCS1-Expression korrelierte (Abb. 19, obere Reihe). Die STAT-Proteine werden allgemein in Verbindung mit der Entwicklung von T-Effektorzellsubpopulationen gebracht. Demzufolge ist STAT1 neben T-bet, IL-12 und STAT4 assoziiert mit der Entwicklung von T_H1-Zellen. Der Differenzierungsprozess von T_H2-Zellen hingegen ist an die Expression von STAT6, IL-4 und GATA3 gekoppelt [71].

Irf1, *interferon regulatory factor 1*, ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Expression von Interferon α und Interferon β reguliert, war auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen herunterreguliert im Vergleich zur splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 19, obere Reihe). Bei Stimulationsexperimenten von CD4⁺ T-Zellen und anschließenden mRNA-Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Irf1 nicht notwendig für die IL-23-abhängige Differenzierung von T_H17-Zellen ist [127]. Zusammenfassend ergab die Analyse, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen auf molekularer Ebene mit der Hochregulation von ROR α , ROR γ und SOCS1 einen T_H17-Phänotyp zeigten.

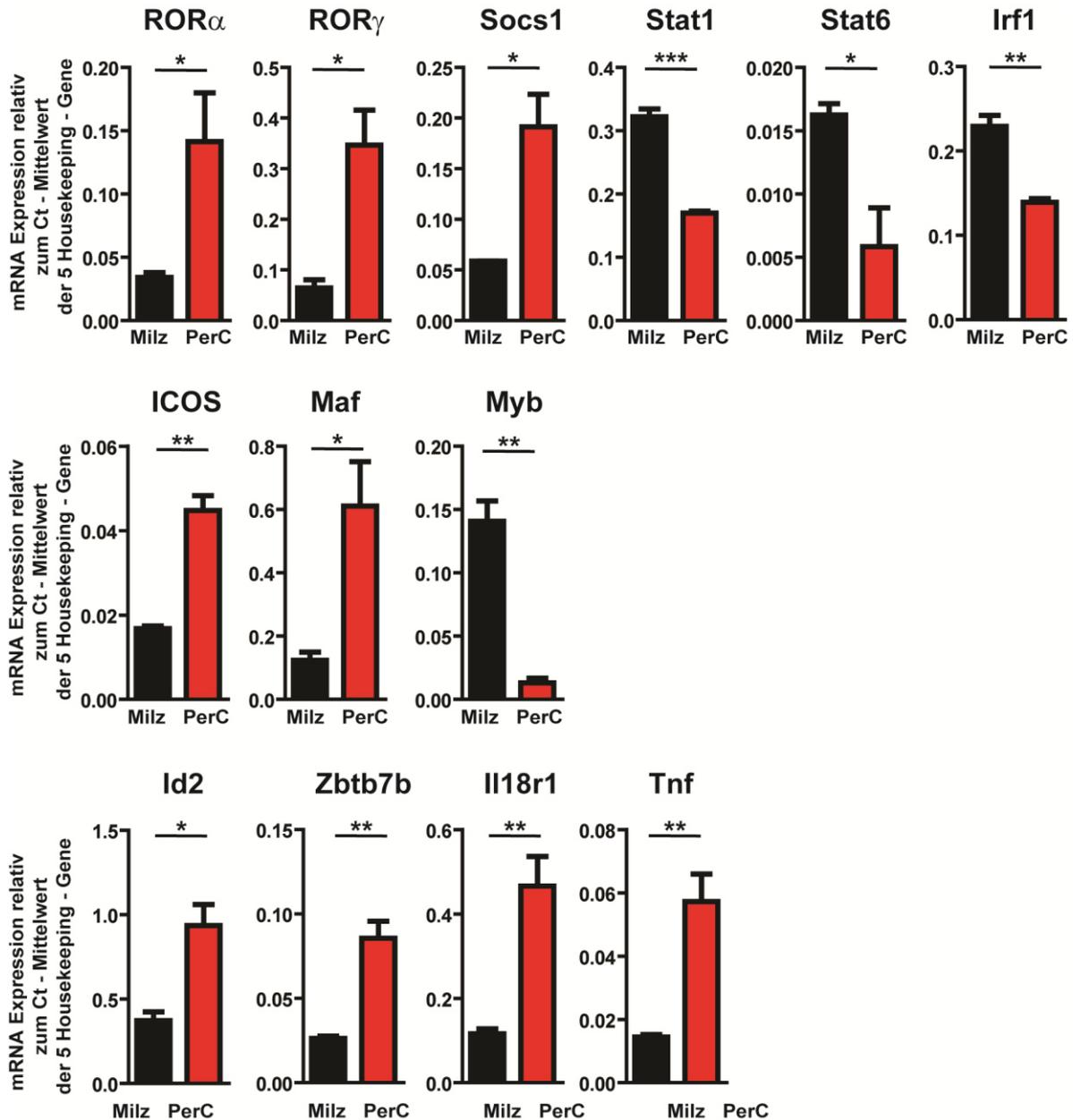


Abb. 19: Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen auf molekularer Ebene einen aktivierten T_H17-Phänotyp

Für komparative quantitative RT-PCR-Analysen wurde RNA aus FACS-sortierten splenozytären CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen und peritonealen B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen isoliert. Die cDNA wurde anschließend auf den *Mouse T Cell Differentiation Array* (SA Bioscience) aufgetragen und hinsichtlich der Expressionslevel zahlreicher Gene untersucht. Gegenübergestellt sind die mRNA Expressionen der einzelnen Gene von $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz (schwarze Balken) und Peritoneum (rote Balken) relativ zur mRNA Expression des Ct-Mittelwertes der 5 *Housekeeping Gene*. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit n = 10 Mäusen pro Gruppe pro Experiment. * p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001; ungepaarter Student's t-Test.

Des Weiteren war die Expression von ICOS, dem *Inducible T-cell costimulator*, in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen zweifach im Vergleich zu $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz hochreguliert (Abb. 19, mittlere Reihe). Das kostimulatorische Molekül ist auf ruhenden T-Gedächtniszellen und aktivierten T-Zellen exprimiert und unterstützt neben T-Zellproliferation auch die Zytokinproduktion der Antigen-stimulierten T-Zellen [128, 129]. In ICOS-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass diese weniger T_H17 -Zellen besitzen und auch die IL-17-Produktion der T_{FH} -Zellen beeinträchtigt ist. Mechanistische Grundlage dieses Prozesses bildet die Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors c-Maf, der durch ICOS induziert wird und dessen genetischer Defekt in verminderter IL-21-Produktion resultiert. Das Zytokin ist in den Differenzierungsprozess von T_H17 -zellen involviert [130]. Folglich zeigen ICOS-defiziente Mäuse durch verminderte c-Maf Expression eine reduzierte T_H17 - und T_{FH} -Zellzahl [131]. In Korrelation mit der ICOS-Expression war in $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums auch die Expression des Transkriptionsfaktors c-Maf um das Dreifache hochreguliert im Vergleich zur Milz (Abb. 19, mittlere Reihe). Interessanterweise wurde im Jahr 2009 von Sato und Kollegen gezeigt, dass c-Maf auch ICOS-unabhängig den Differenzierungsprozess und die Generierung von T_H17 -Zellen mit Gedächtnisfunktion induzieren kann [132].

Die Analyse der Genexpressionlevel zeigte auch, dass die Expression des Transkriptionsfaktors c-Myb, *myeloblastosis oncogene*, in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen dreifach herunterreguliert war im Vergleich zur Milz (Abb. 19, mittlere Reihe). Die Untersuchung peripherer $CD4^+$ T-Zellen beispielsweise ergab, dass c-Maf die Expression von c-Myb durch Komplexbildung inhibiert. Dadurch führte eine verminderte Expression von Bcl2, einem antiapoptotischen Protein, zu einer vermehrten Apoptose von $CD4^+$ T-Zellen [133]. Die hohe Expression von c-Maf in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen korreliert folglich mit einer verminderten Expression von c-Myb.

Die durchgeführten Analysen konnten zusammenfassend zeigen, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Expression von ICOS auch auf molekularer Ebene einen aktivierten Phänotyp zeigten. Die hochregulierte Expression von c-Maf unterstützt zusätzlich zur im ersten Abschnitt beschriebenen ROR α -, ROR γ - und SOCS1-Expression den T_H17 -Phänotyp der $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum.

Neben relevanten Transkriptionsfaktoren, die den Differenzierungsprozess und die Effektorfunktionen von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen sowie deren Aktivierungsstatus steuern, waren auch eine Reihe von Genen verändert, die auf regulatorischer Ebene eine Rolle spielen. Der transkriptionelle Regulator Id2, *inhibitor of DNA binding 2*, war in $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums zweifach im Vergleich zur Milz hochreguliert (Abb. 19, untere Reihe). In Analysen eines Infektionsmodells der Maus mit *Listeria monocytogenes* war Id2 mRNA in der $CD8$ -

Effektorphase hochreguliert und wurde auch in CD8⁺ T-Gedächtniszellen exprimiert [134]. Dies könnte ein Hinweis sein, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen neben dem in der Durchflusszytometrie ermittelten Aktivierungsmarker CD44 auch auf molekularer Ebene mit der Expression von Id2 einen Gedächtnis-Phänotyp zeigen.

Das Zinkfingerprotein Zbtb7b kann über seine schleifenförmige Struktur direkt mit der DNA interagieren. In peripheren CD4⁺ T-Zellen wurde eine Schlüsselfunktion von Zbtb7b bei der Repression von CD8 abhängigen Genen ermittelt und *vice versa* in der Aufrechterhaltung des CD4⁺ Phänotyps [135]. Die hochregulierte Genexpression von Zbtb7b in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 19, untere Reihe) könnte somit auch einen Einfluss auf die Differenzierung der $\gamma\delta$ T-Zellen in unterschiedliche Effektorzellpopulationen und deren Aufrechterhaltung im Peritoneum haben.

Das Zytokin IL-18 wird von aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen produziert und regt unter anderem Natürliche-Killer-Zellen und T-Zellen dazu an, Interferone zu sezernieren. Der korrespondierende Rezeptor IL18R1 ist essentiell für den IL-18-abhängigen Signaltransduktionsprozess. IL-18 unterstützt unter anderem T_H1- und T_H17-vermittelte Immunantworten [136-138]. Somit könnte die hochregulierte Expression des IL18R1 (Abb. 19, untere Reihe) auch auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer verstärkten T_H17-Antwort assoziiert sein.

Das proinflammatorische Zytokin Tnf (*tumor necrosis factor*) ist in $\gamma\delta$ T-Zellen der Bauchhöhle dreifach hochreguliert im Vergleich zu denen der Milz (Abb. 19, untere Reihe). Dies unterstützt zum einen die Hypothese, dass $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums eine Mediatorfunktion bei entzündlichen Prozessen haben, andererseits könnte TNF auch die frühe $\gamma\delta$ T-Zellaktivierung unterstützen [139].

3.3 Das peritoneale Mikromilieu hat Einfluss auf die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von $\gamma\delta$ T-Zellen

3.3.1 Immunologische Plastizität in der Peripherie

Um den Einfluss des Mikromilieus des Peritoneums auf den Phänotyp und die Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit adoptive Transferexperimente von Splenozyten ins Peritoneum durchgeführt. Für splenozytäre B2-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass diese nach intraperitonealer Injektion den Phänotyp residenter peritonealer B2-Zellen annehmen. Nach *Imprinting* der transferierten Splenozyten in der Mikroumgebung des Peritoneums zeigten diese eine Hochregulation der *Homing*moleküle CXCR5, CXCR4 und $\beta 7$ -Integrin [56]. Ähnliches wurde für B1-Zellen, eine B-Zellsubpopulation, die vorwiegend im Peritoneum und in der Pleura zu finden ist, gezeigt. Nach intravenösem Transfer von B1a-Splenozyten in Rag1^{-/-} Mäuse und Reisolation der transferierten Zellen aus dem Peritoneum zeigten diese Genexpressionslevel, die denen der ortsständigen peritonealen B1a-Zellen entsprachen [57]. Resümierend beweisen diese Untersuchungen die Plastizität von B1 und B2-Zellen in der Peripherie. Zudem unterstreichen sie den Einfluss der peritonealen Mikroumgebung auf die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von B-Zellen. Für $\gamma\delta$ T-Zellen wurde im Gegensatz dazu in der Literatur beschrieben, dass diese ihren Phänotyp mit dazugehörigen Effektorfunktionen bereits während intrathymischer Differenzierungsprozesse erwerben und dass dieser in der Peripherie, auch unter einer Infektion, relativ stabil bleibt [27]. Zur Charakterisierung und Funktion peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen ist in der aktuellen Literatur bisher wenig beschrieben.

Im Fokus der durchgeführten Analysen stand daher die Frage, ob $\gamma\delta$ T-Zellen in der Peripherie immunologische Plastizität zeigen und durch *Priming* im Peritoneum einen Phänotyp erwerben, der ihre Migration in das entzündete Kolon unterstützen könnte.

3.3.2 Splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen erwerben einen peritonealen Phänotyp nach intraperitonealem *Priming*

Für den adoptiven Zelltransfer wurden ca. $3-6 \times 10^8$ Splenozyten aus CD45.2 C57Bl6 Donormäusen isoliert und in die Peritonealhöhle von CD45.1 C57Bl6 Empfängertieren injiziert. Drei Tage nach Transfer erfolgte die Reisolation aus dem Peritoneum und durchflusszytometrische Analyse (Abb. 20A). Bei dieser wurde über die Expression von CD45.2 zwischen transferierten und nicht transferierten Zellen unterschieden. Auf den CD45.2⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle und Integrine CD44 und LFA-1 überprüft (Abb. 20B, repräsentative *Dotplots* für die Expression von CD44). Als

Kontrolle dienten die Expressionslevel auf B220⁺ B-Zellen, da hier bereits gezeigt wurde, dass das peritoneale Mikromilieu deren phänotypische Charakteristika moduliert [56] (unveröffentlichte Daten, Solveig Tetzlaff).

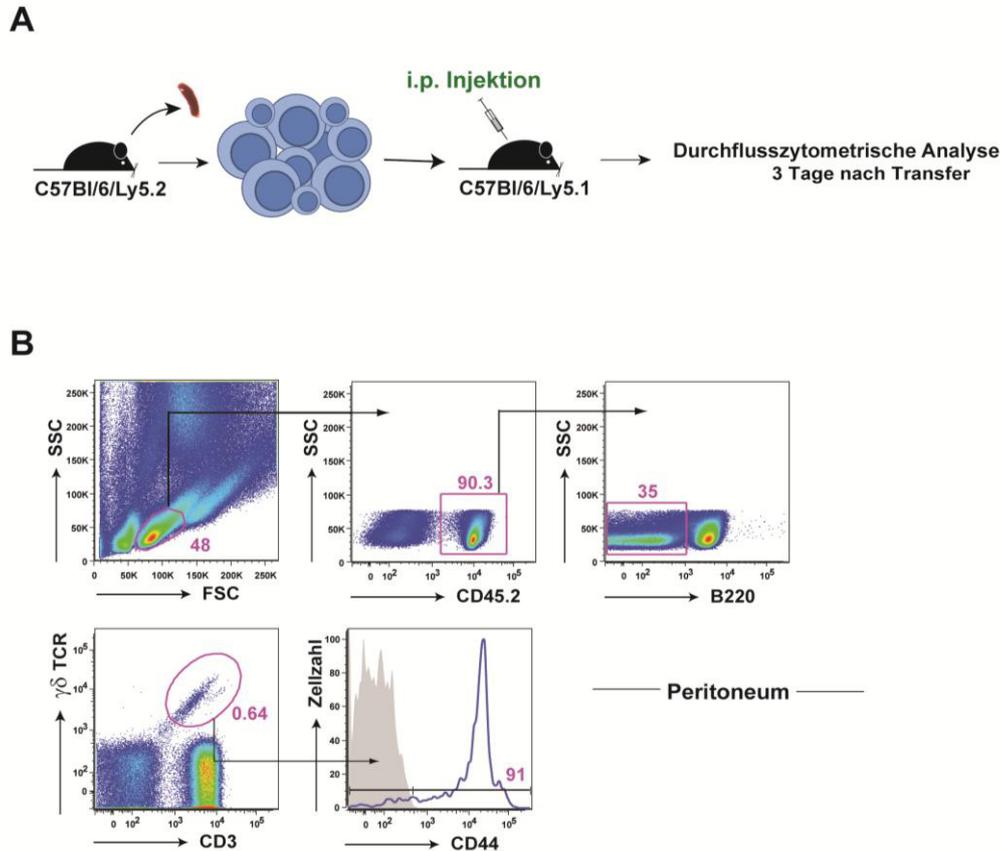


Abb. 20: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs und repräsentative *Gating-Strategie* splenozytärer $\gamma\delta$ T-Zellen nach intraperitonealem *Priming*

(A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Intraperitonealer Transfer von isolierten und aufgereinigten Splenozyten aus CD45.2 C57BL/6 Tieren in kongene CD45.1 C57BL/6 Empfängermause. Drei Tage nach Transfer wurden die Zellen aus dem Peritoneum reisoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD44 und LFA-1 analysiert. (B) Abgebildet ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse der peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen. Zur Unterscheidung zwischen transferierten und nicht-transferierten Zellen wurden die Lymphozyten mit anti-CD45.2 gefärbt und im Anschluss die Expressionslevel der Adhäsionsmoleküle auf den CD45.2^{high} tragenden B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen untersucht. Isotypkontrolle: grau schattierte Kurve.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass die Expression von CD44 (siehe Abb. 21) und LFA-1 (unpublizierte Daten, Solveig Tetzlaff) auf den reisolierten CD45.2⁺ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen nach intraperitonealem *Priming* signifikant höher war im Vergleich zu CD45.2⁻ B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen der Milz. B220⁺ B-Zellen wiesen bei CD44 eine ähnlich hohe

Expression auf. Die Expression von LFA-1 war auf peritonealen und splenozytären B-Zellen gering (unveröffentlichte Daten, Solveig Tetzlaff).

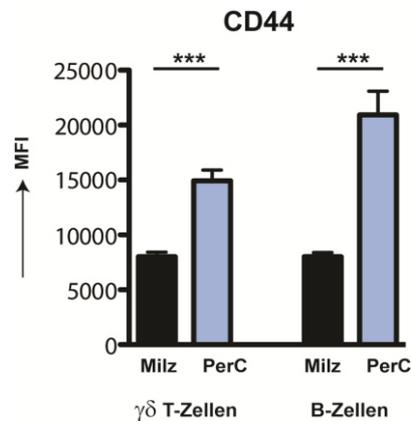


Abb. 21: Splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen nach intraperitonealem *Priming* eine Hochregulation von CD44 und erlangen einen peritonealen Phänotyp

Dargestellt ist der Anteil der $CD45.2^{high} B220^{-} CD3^{+} \gamma\delta TCR^{+}$ T-Zellen, die positiv für die Expression von CD44 in Milz (n = 7) oder Peritoneum (n = 10) waren im Vergleich zu den Expressionsleveln auf $B220^{+}$ B-Zellen in Milz (n = 7) oder Peritoneum (n = 10). Balken repräsentieren das arithmetische Mittel und Standardfehler (SEM). *** p < 0,001; ungepaarter Mann-Whitney Test (n.s., nicht signifikant).

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz nach Residenz und *Imprinting* im Mikromilieu des Peritoneums einen peritonealen, aktivierten Phänotyp erwerben (siehe Kap. 3.2.2). Die Expression von CD44 und LFA-1 kennzeichnet zudem einen Phänotyp, der mit Migration in den Darm assoziiert wird. Folglich ändert das Peritoneum nicht nur die Expressionslevel von Integrinen und Adhäsionsmolekülen, sondern legt über diesen *Imprinting*mechanismus auch ein organspezifisches- und gerichtetes Migrationsverhalten von $\gamma\delta$ T-Zellen fest.

3.4 Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen unterstützen lokal Immunantworten im entzündeten Kolon

3.4.1 Adoptiver Zelltransfer von Splenozyten und *Homing* in das entzündete Kolon

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass das peritoneale Mikromilieu die phänotypischen und funktionellen Merkmale von $\gamma\delta$ T-Zellen verändert und damit auch einen Einfluss auf deren Migrationsverhalten haben könnte. Daraus ergab sich die Frage, ob splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen nach intraperitonealem *Priming* in das entzündete Kolon migrieren können, um dort lokale Immunantworten unterstützend zu modulieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass $\gamma\delta$ T-Zellen nach intraperitonealer Injektion im Bauchraum verbleiben und ohne

Homing in das Kolon ihre Effektorfunktionen von der Seite des Peritoneums ausüben. Für naive B-Zellen und Plasmablasten konnte bereits gezeigt werden, dass diese nach *Priming* durch das peritoneale Mikromilieu vermehrt in den Dünndarm einwandern [56].

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden Transferexperimente von Splenozyten in das Peritoneum von Mäusen durchgeführt, bei denen durch DSS-Gabe eine akute Kolitis induziert wurde. Ab dem ersten Tag wurde bei den C57Bl/6/Ly.5.1 Rezipienten 3 % DSS über Trinkwasser verabreicht, welches zu epithelialer Zellzerstörung führt. Nach 3-4 Tagen entwickelte sich dann eine akute Entzündung im Kolon der Tiere. Der intraperitoneale Transfer MACS-aufgereinigter Splenozyten von Donormäusen erfolgte an Tag fünf. Die Isolation der LP-Lymphozyten und IEL-Lymphozyten sowie die durchflusszytometrische Analyse erfolgte 24 Std. bzw. 36 Std. nach Transfer, um zu überprüfen, ob $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peritoneum in das Kolon migriert waren (Abb. 22).

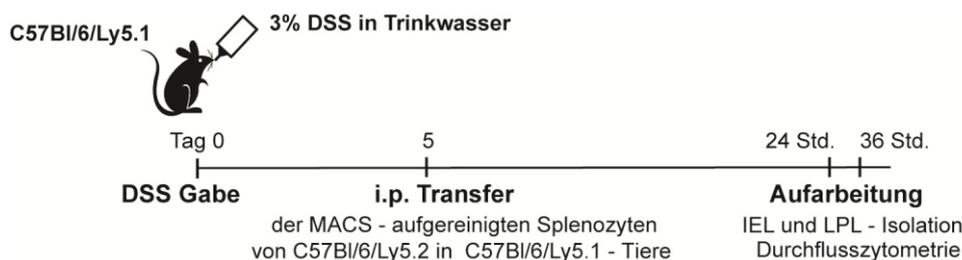


Abb. 22: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der intraperitonealen Transferexperimente

Zeitlicher Versuchsablauf der intraperitonealen Transferexperimente im Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis (i.p., intraperitoneal). Am Tag 0 wurde den CD45.1 C57BL/6 Empfängermäusen 3% DSS im Trinkwasser verabreicht, welches eine Entzündung im Kolon induzierte. Nach 4-5 Tagen wurde die DSS-Gabe abgesetzt und allen Tieren wurden gleiche Anteile MACS-aufgereinigter Splenozyten von CD45.2 C57BL/6 Donormäusen intraperitoneal injiziert. 24 Std. bzw. 36 Std. nach Transfer wurde in den Empfängertieren durchflusszytometrisch der Anteil transferierter Zellen über die Expression von CD45.2^{high} im IEL und in der LP im Kolon bestimmt. Zur Untersuchung der Oberflächenexpression von CD45.2, B220, CD3 und $\gamma\delta$ TCR wurden für einen Datenpunkt drei Empfängertiere gepoolt.

Auf den isolierten Lymphozyten der LP und des IEL wurde über die Expression von CD45.2 der Anteil transferierter Zellen bestimmt. Bei den CD45.2^{high} B220⁻ T-Zellen wurde über CD3 und $\gamma\delta$ TCR der Anteil transferierter $\gamma\delta$ T-Zellen ermittelt (Abb. 23A). Sowohl in der LP als auch IEL konnten CD45.2^{high} B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen identifiziert werden, wobei der Anteil an gesamtisolierten Lymphozyten in beiden Kompartimenten mit 5-15 % Schwankungen unterlag. In der LP war der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen mit ca. 10 % an transferierten Zellen höher als im IEL,

wo nur ca. 3 % der isolierten Zellen als $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert wurden. Der Unterschied zwischen der LP und dem IEL war nicht signifikant (Abb. 23B).

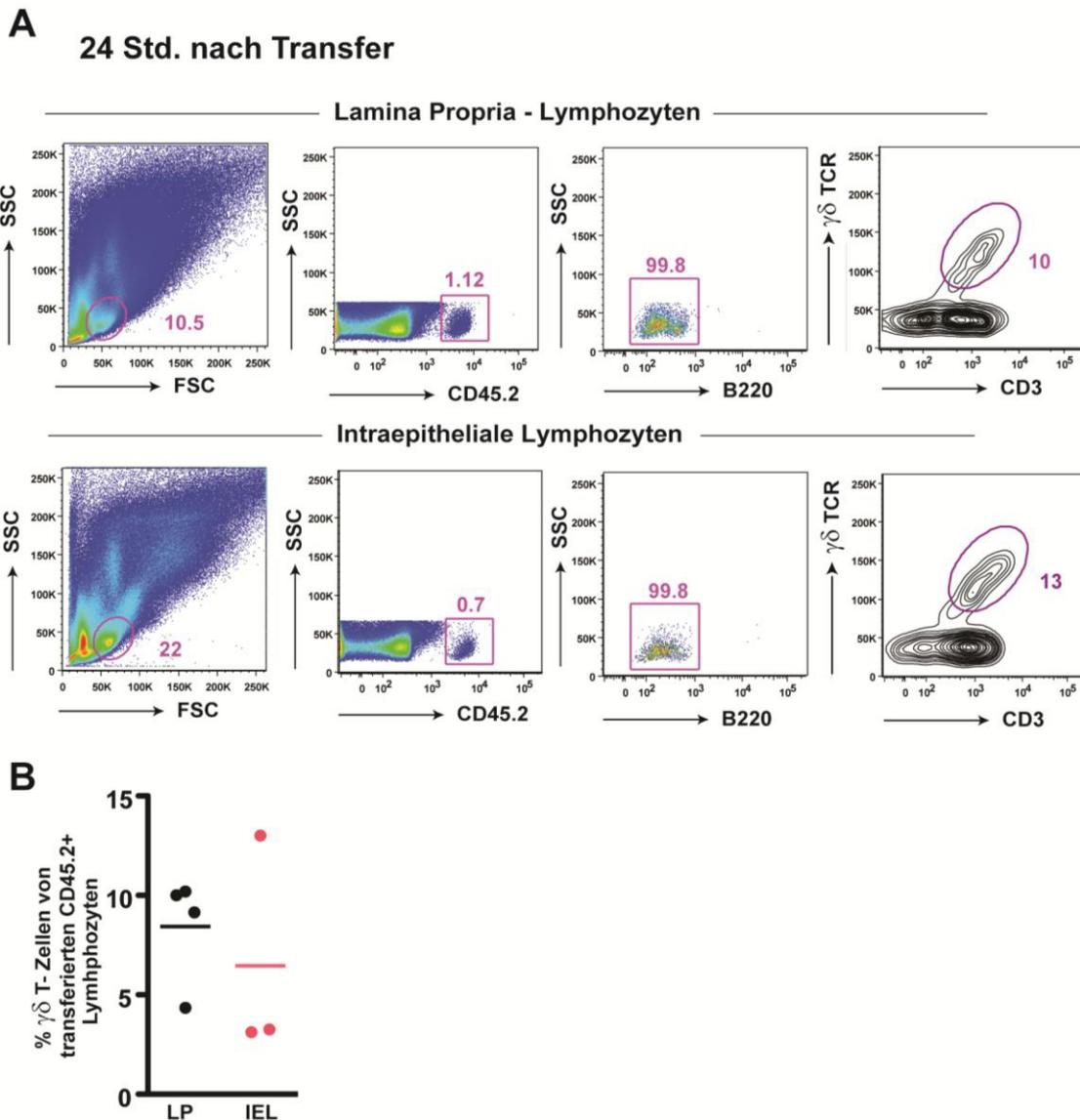


Abb. 23: Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen migrieren in das entzündete Kolon

(A) Repräsentative *Dotplots* der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung des Anteils transferierter Zellen 24 Std. nach Transfer in der LP und im IEL. Zur Differenzierung zwischen transferierten und nicht-transferierten Zellen wurde die Expression von CD45.2 analysiert. Bei den CD45.2⁺ Lymphozyten wurde über die Expression von B220 die MACS-Zellseparation verifiziert und bestätigt, dass es sich bei den transferierten, CD45.2^{high} B220⁻ Zellen, um eine reine T-Zellpopulation handelte. Diese Population wurde zur Identifizierung transferierter $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Expression von CD3 und $\gamma\delta$ TCR untersucht. Als Kontrolle dienten CD45.1 C57BL/6 Tiere, denen keine Zellen injiziert wurden. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD45.2^{high} B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ T-Zellen in der LP (n = 4) und im IEL (n = 3) 24 Std. nach Transfer. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Tiere und den Mittelwert.

Auch 36 Std. nach Transfer konnte in den Empfängermäusen in beiden Kompartimenten des entzündeten Kolons ein Anteil transferierter Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden (Abb. 24A). Im IEL lag der Anteil $CD45.2^{high} B220^{-} CD3^{+} \gamma\delta TCR^{+}$ T-Zellen zwischen ca. 5-25 % jetzt höher als in der LP mit ca. 5 % $CD45.2^{high} B220^{-} CD3^{+} \gamma\delta TCR^{+}$ T-Zellen, war jedoch nicht signifikant erhöht. Hier wurden ebenfalls starke Unterschiede in den einzelnen Experimenten registriert (Abb. 24B).

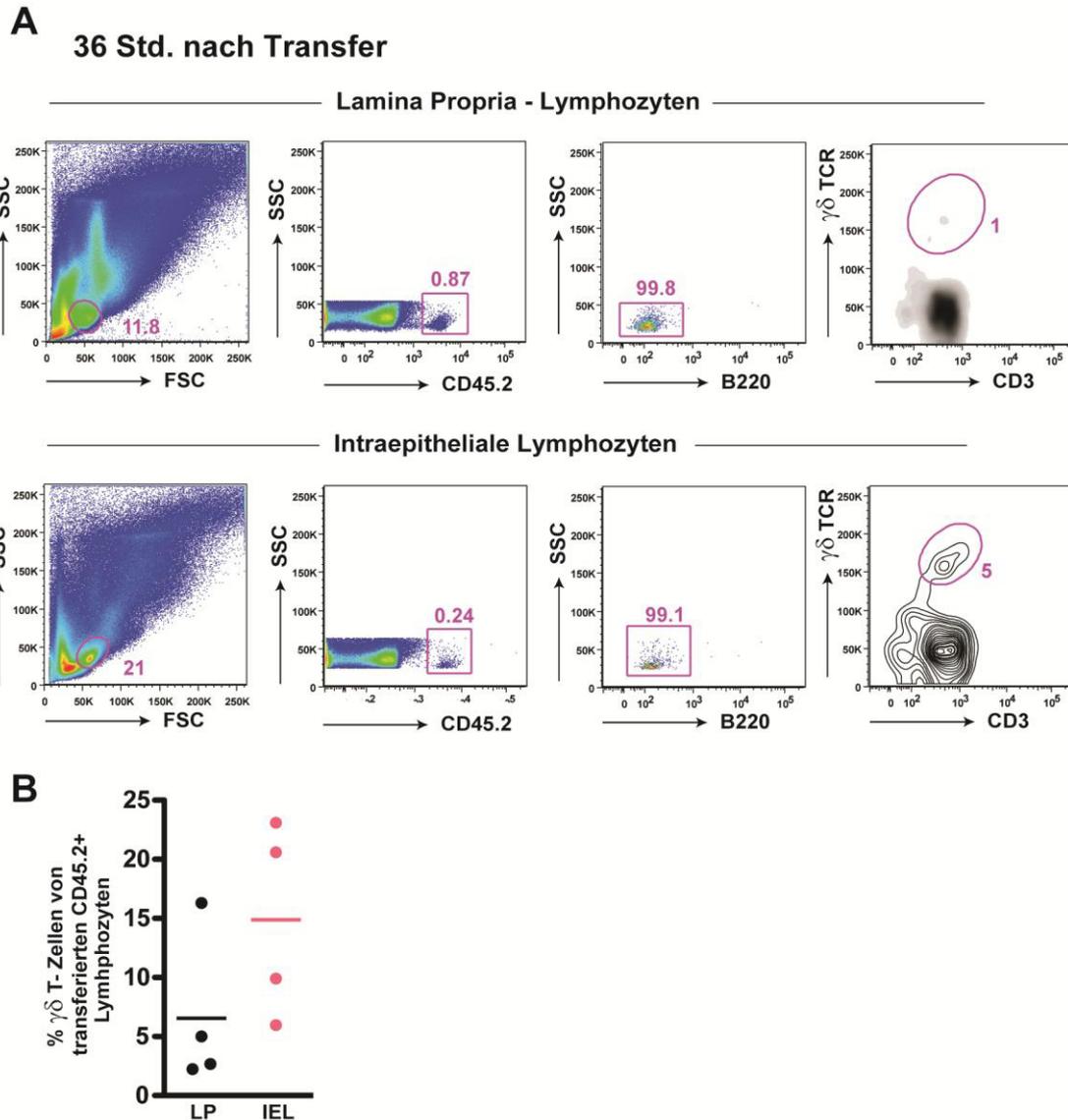


Abb. 24: Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen sind auch nach 36 Std. im entzündeten Kolon nachweisbar

(A) Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils transferierter Zellen 36 Std. nach Transfer in der LP und im IEL. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil $CD45.2^{high} B220^{-} CD3^{+} \gamma\delta TCR^{+}$ T-Zellen im IEL (n = 4) und in der LP (n = 4) 36 Std. nach Transfer. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Tiere und den Mittelwert.

Eine Übersicht der durchgeführten Transferexperimente gibt Tab. 5.

Tab. 5: Tabellarische Übersicht der durchgeführten Transferexperimente

		LP		IEL		
	Transferierte Zellen	Totaler Anteil an transferierten Zellen in %	% Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen nach Transfer	Totaler Anteil an transferierten Zellen in %	% Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen nach Transfer	
1	$1,44 \times 10^8$	0,73	9,15	0,84	3,12	24 Std.
2	$1,29 \times 10^8$	1,07	4,35	7,51	3,26	
3	$7,41 \times 10^7$	1,12	10,00	0,70	13,00	
4	$7,19 \times 10^8$	2,84	10,20			
1	$1,61 \times 10^8$	6,06	16,30	5,73	20,60	36 Std.
2	$1,33 \times 10^8$	0,17	5,00	7,58	23,10	
3	$1,35 \times 10^8$	0,39	2,23	1,32	9,90	
4	$1,51 \times 10^8$	0,87	1,00	0,24	5,00	

Zusammenfassend zeigten die vorhergehenden Experimente, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage sind, in das Kolon einzuwandern um lokale Immunantworten im Rahmen einer akuten Entzündung sowohl im IEL als auch in der LP zu unterstützen.

3.4.2 Chemokinrezeptorabhängiges Migrationsverhalten von $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peritoneum in das entzündete Kolon um einen chemokinrezeptorabhängigen-Prozess handelt, wurden intraperitoneale Transferversuche mit gleichen Anzahlen ca. $3-5 \times 10^7$ Pertussistoxin behandelte und unbehandelte Splenozyten je Tier durchgeführt.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der LP und des IEL ist jeweils der Transfer Pertussistoxin-unbehandelter Zellen als Kontrolle dem Transfer mit Pertussistoxin-behandelten Zellen gegenübergestellt. Zur Unterscheidung zwischen transferierten und nicht-transferierten Zellen wurde die Expression des Panleukozytenmarkers CD45.2 bestimmt (Abb. 25A). Pertussistoxin bindet an die $G_{i\alpha}$ -Untereinheit $G_{i\alpha}$ -gekoppelter Chemokinrezeptoren und inhibiert deren Signaltransduktionsprozesse.

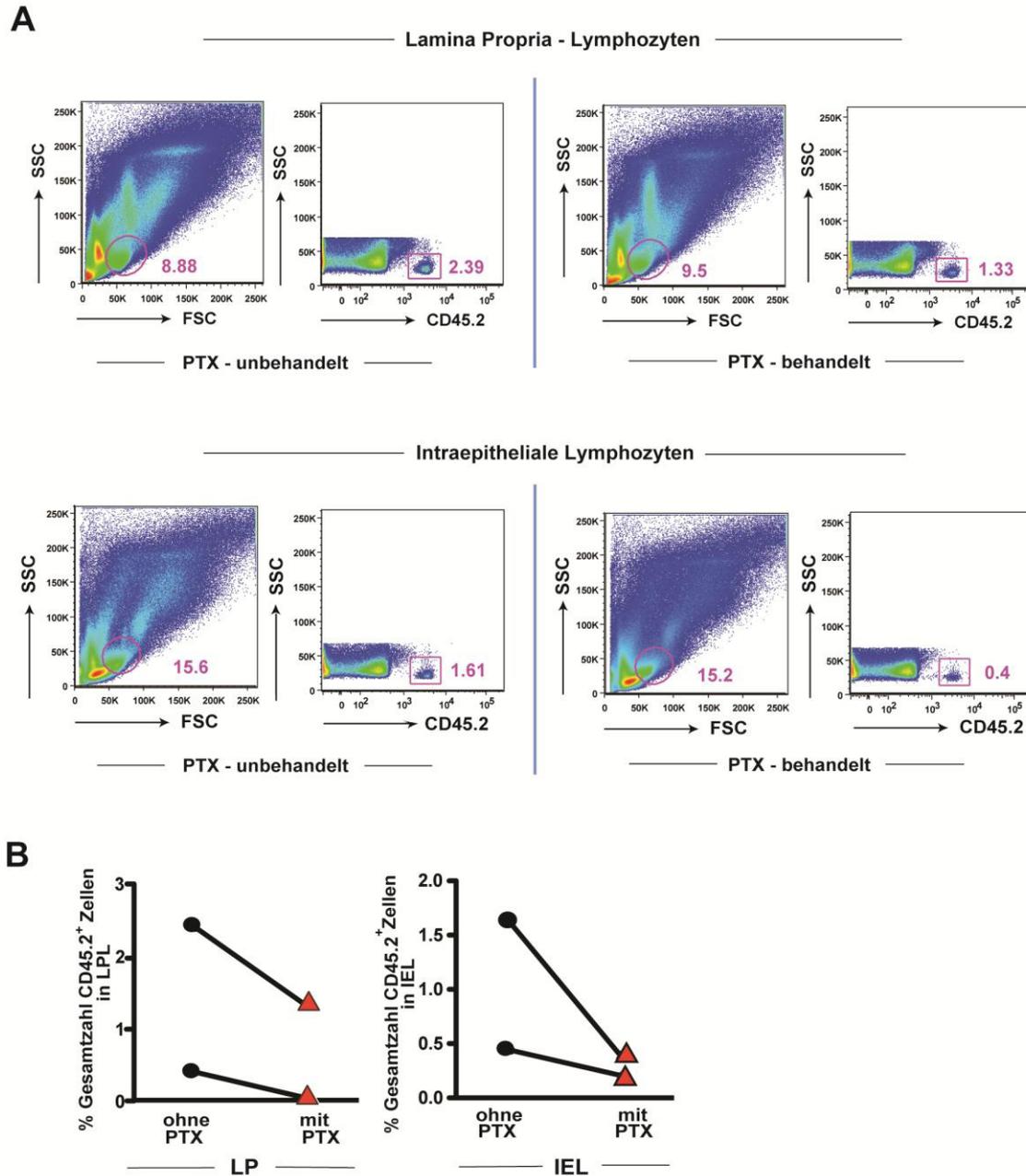


Abb. 25: Die Migration von peritonealen Lymphozyten in das entzündete Kolon stellt einen *Gia*-gekoppelten Prozess dar

(A) Repräsentative durchflusszytometrische Analysen der LP und des IEL des Kolons, wobei jeweils zwischen dem Transfer CD45.2⁺ Pertussistoxin-behandelter Zellen und unbehandelter Zellen in kongene Empfängermäuse unterschieden wird. Es wurden intraperitoneal gleiche Anteile Pertussistoxin behandelte und unbehandelte Zellen in jeweils drei Empfängertiere pro Gruppe injiziert, welche bereits eine DSS-induzierte Kolitis entwickelt hatten. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte 24 Std. nach Transfer, wobei die drei Empfängertiere der jeweiligen Gruppe für eine Analyse zusammengefasst wurden. Als Negativkontrolle dienen Mäuse, denen keine Zellen transferiert wurden. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil Pertussistoxin-behandelter (Dreiecke) und unbehandelter Zellen (Kreise) an gesamttransferierten Zellen als Matched-Pair-Analyse von zwei unabhängigen Experimenten.

In zwei unabhängig durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation mit Pertussistoxin der Anteil der Zellen, der aus dem IEL des Kolons isoliert wurde, um die Hälfte bzw. um das Vierfache reduziert war im Vergleich zum Transfer unbehandelter Zellen. In der LP war der Anteil migrierter Zellen nach Inkubation mit Pertussistoxin ebenfalls reduziert (Abb. 25B). Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass nach Behandlung der aufgereinigten Splenozyten mit Pertussistoxin der Anteil der Zellen, die in den Kolon eingewandert waren, deutlich erniedrigt war. Demzufolge scheint der Migrationsprozess von Lymphozyten einschließlich $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Peritonealhöhle in das entzündete Kolon abhängig von G α -Protein gekoppelten Rezeptoren zu sein.

3.4.3 Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon in Abhängigkeit von der Applikationsroute

Nach vorangegangenen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die Einwanderung von Zellen aus dem Peritoneum in das Kolon ähnlich effizient ist wie das *Homing* über die intravenöse Route. Dafür wurden kompetitive Migrationsexperimente durchgeführt, bei denen zuerst die eineinhalbfache Menge an isolierten Splenozyten in das Peritoneum von C57Bl/6/Ly5.1 Rezipienten injiziert wurde. Im Anschluss, ca. 30 min nach intraperitonealer Injektion, erfolgte die intravenöse Applikation von SNARF-gelabelten Zellen oder isolierten Splenozyten aus RFP-Mäusen. Nach Transfer erfolgten 24 Std. später die Aufarbeitung der Tiere und die Isolation von Lymphozyten aus der LP und dem IEL (Abb. 26A).

In der durchflusszytometrischen Analyse wurde zunächst das Lymphozytengate gesetzt. Im Anschluss wurde durch die Expression von CD45.2 zwischen transferierten und nicht-transferierten Lymphozyten differenziert. Über die im PE-Kanal detektierte Fluoreszenz konnte innerhalb der LP (Abb. 26B, oben) und im IEL (Abb. 26B, unten) zwischen intraperitoneal (schwarze *Dotplot*-Wolke) und intravenös applizierten Zellen (rote *Dotplot*-Wolke) unterschieden werden.

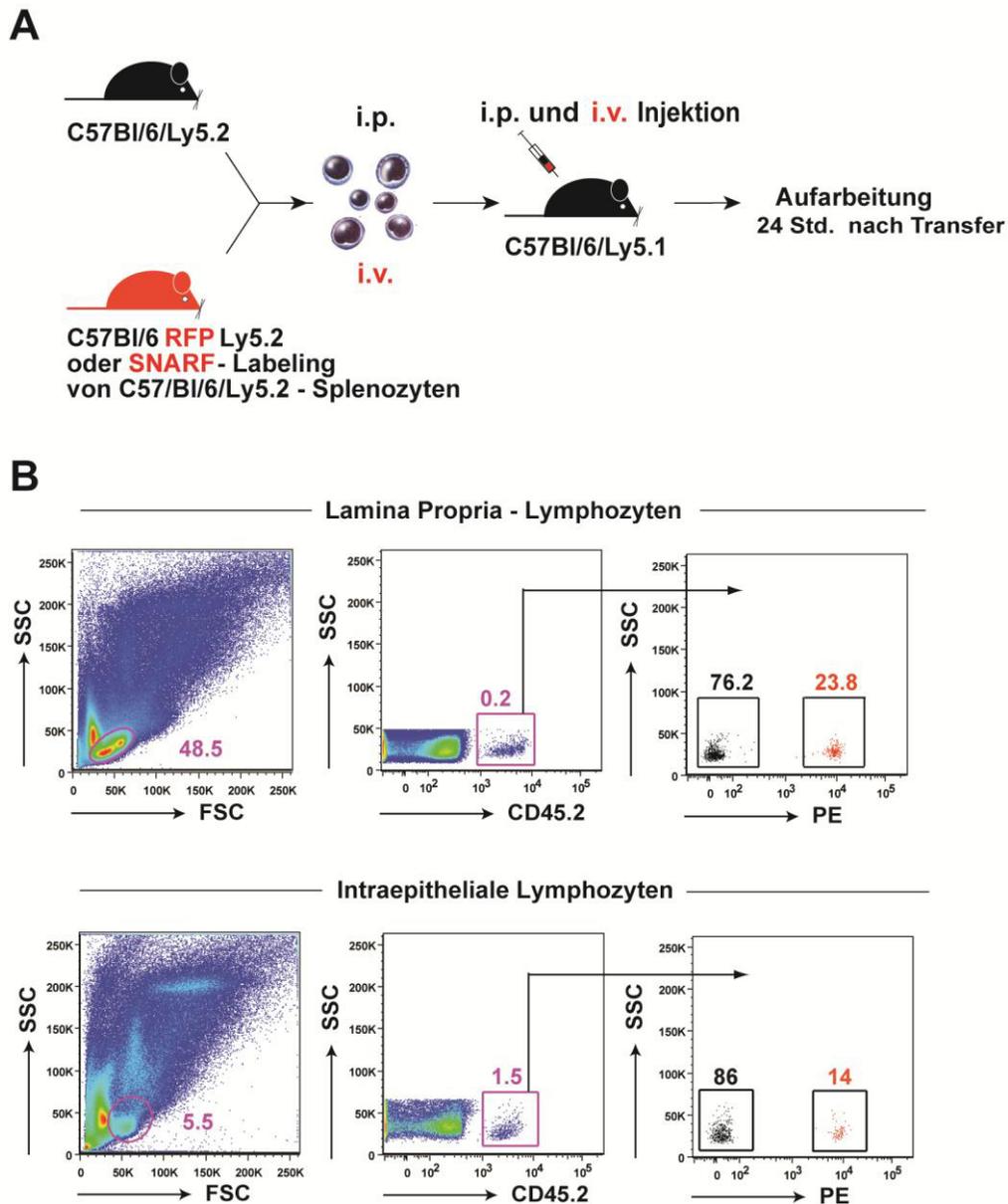


Abb. 26: Schematische Darstellung der vergleichenden Migration intravenös und intraperitoneal injizierter Lymphozyten sowie repräsentative *Gating*-Strategie in der *Dotplot*-Darstellung

(A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der kompetitiven Transferexperimente. MACS-aufgecleanigte $CD45.2^+$ Splenozyten wurden aus Wt-Milzen gewonnen. Im ersten Schritt wurden jeweils ca. 3×10^6 der isolierten Zellen intraperitoneal in drei kongene $CD45.1$ C57BL/6 Empfängermäuse mit DSS-Kolitis transferiert. Nach 30 Minuten erfolgte die intravenöse Injektion von je $1,5 \times 10^6$ SNARF-1 markierten Lymphozyten in die gleichen drei Empfängertiere. Alternativ wurden Wt-Tiere für den intraperitonealen Transfer und RFP-Mäuse für die intravenöse Applikation verwendet. 24 Std. nach kompetitivem Transfer erfolgte die Aufarbeitung, wobei die drei Empfängertiere zur durchflusszytometrischen Untersuchung für einen Datenpunkt zusammengefasst wurden. (B) Repräsentative *Dotplots* der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung des Anteils transferierter, $CD45.2^{\text{high}}$ -exprimierender Zellen. Zur Differenzierung der intraperitoneal und intravenös applizierten Zellen wurde der PE-Kanal genutzt. Als Kontrolle dienten $CD45.1$ C57BL/6 Tiere, denen keine Zellen injiziert wurden.

Von den CD45.2^{high} tragenden Lymphozyten innerhalb der LP waren 40-95 % über die intraperitoneale Route in das Kolon eingewandert. Der Anteil isolierter Zellen, die den intravenösen Weg genommen hatten, lag bei 5-60 %. Im IEL war der Anteil der CD45.2^{high} tragenden, intraperitoneal injizierter Lymphozyten mit ca. 70 % signifikant erhöht gegenüber der Anzahl intravenös transferierter Splenozyten mit ca. 25-40 % (Abb. 27).

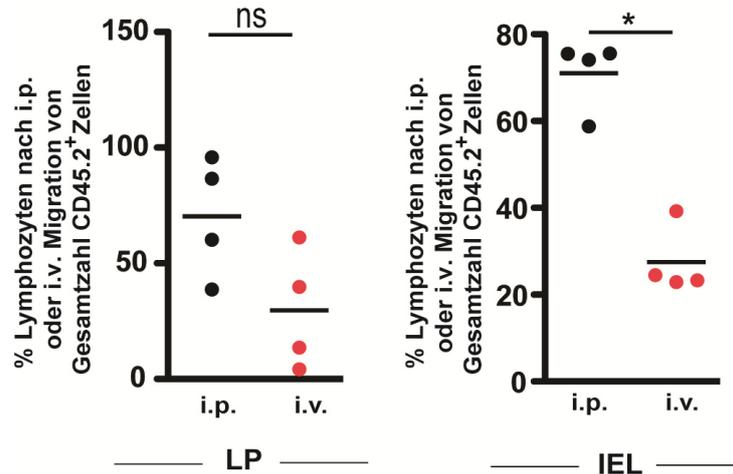


Abb. 27: Intraperitoneal und intravenös injizierte Splenozyten zeigen ein vergleichbares Migrationsverhalten in das entzündete Kolon

Dargestellt ist der prozentuale Anteil i.p. (PE neg.) oder i.v. (PE pos.) transferierter Zellen an gesamttransferierten CD45.2^{high} Zellen im IEL (n = 3) oder in der LP (n = 3). Das Migrationsverhalten wurde in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Tiere und den Mittelwert.*p < 0,05; ungepaarter Mann-Whitney Test (n.s., nicht signifikant).

Es kann hiermit geschlussfolgert werden, dass intraperitoneal injizierte T-Zellen, folglich auch $\gamma\delta$ T-Zellen, mindestens eine vergleichbare Migration in das entzündete Kolon zeigen wie intravenös applizierte Lymphozyten. Was das IEL betrifft, war die Migration von Lymphozyten über die peritoneale Route sogar deutlich effizienter.

4. DISKUSSION

Über eine kontinuierliche und kontrollierte Rezirkulation von Immunzellen durch den Körper und deren gewebspezifische Rekrutierung gelingt es dem menschlichen Organismus die komplex regulierte Immunhomöostase aufrechtzuerhalten. Im mukosalen Immunsystem des Kolons kommt es im Rahmen einer akuten Entzündung zur Translokation kommensaler Mikroorganismen und Bakterien in das (sub)epitheliale Gewebe. Das entzündliche Milieu führt dann einerseits zur lokalen Aktivierung von Immunzellen, andererseits werden auch Effektorzellen aus der Peripherie rekrutiert. Während das koordinierte Migrationsverhalten von Lymphozyten in den Darm aus sekundär lymphatischen Organen wie dem mesenterialen Lymphknoten (mLN) oder den Peyer-Plaques des Dünndarms bereits gut untersucht ist, ist in der Literatur bisher wenig über die Funktion peritonealer Immunzellen im Rahmen der kontinuierlichen Rezirkulation bekannt. Im Fokus des ersten Teils der vorliegenden Arbeit stand daher die Untersuchung des Phänotyps und der Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen. In einem weiteren Schritt wurde die Modulation von splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen nach Transfer in das peritoneale Mikromilieu analysiert. Es konnte eine entscheidende Rolle des Peritoneums beim *Imprinting* von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Erlangen eines Darm-assoziierten Phänotyps nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das peritoneale Mikromilieu auch auf transkriptioneller Ebene Charakteristika und Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen moduliert. Im dritten Teil der Arbeit wurde das Wanderungsverhalten von $\gamma\delta$ T-Zellen im Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen in den entzündeten Darm migrieren.

4.1 Die peritoneale Mikroumgebung beeinflusst $\gamma\delta$ T-Zellfunktionen

4.1.1 Einfluss auf die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Migrationsverhalten

Voraussetzung für die Induktion einer effektiven Immunantwort sind die koordinierte Migration und Positionierung von Lymphozyten im Gewebe, welche ein komplexes Zusammenspiel spezifischer Oberflächenrezeptoren und ihrer Liganden erfordert. In den Prozess des effizienten *Homing* von Immunzellen in die Mukosa des Darms sind neben dem Chemokin-Chemokinrezeptorsystem auch zahlreiche Adhäsionsmoleküle und Integrine involviert. Bisherige Studien legten dabei den Fokus ihrer Analysen oft auf die gerichtete Migration von

Immunzellen aus organisierten lymphoiden Kompartimenten in das Kolon. Die kontrollierte Rezirkulation, insbesondere der $\gamma\delta$ T-Zellen, aus nicht-organisierten lymphatischen Strukturen und Körperhöhlen wie dem Peritoneum wurde eher vernachlässigt. Erst kürzlich konnten die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7 und CXCR5 mit ihren dazugehörigen Liganden CXCL12, CCL19, CCL21 und CXCL13 als essentielle *Homing*- und Rezirkulationsmediatoren für die Peritonealhöhle identifiziert werden. Sie regulieren lokale Ein- und Auswanderungsprozesse und beeinflussen ebenfalls die peritoneale Immunität, indem sie Immunzellen in der Körperhöhle zurückhalten. Eine CCR7-Defizienz ist demnach mit einer Akkumulation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie B2 B-Zellen in der Peritonealhöhle assoziiert. Des Weiteren vermittelt CCR7 den Austritt von Lymphozyten aus der Bauchhöhle über afferente Lymphgefäße, in denen CCL21 als einer der CCR7-Liganden konstitutiv exprimiert wird [140]. Die funktionelle Rekrutierung von B-Zellen in das Peritoneum wird durch CXCR5 vermittelt, dessen Ligand CXCL13 von peritonealen Makrophagen und Zellen der omentalen *milky spots* produziert wird [53]. Zentral von Bedeutung für eine balancierte peritoneale Rezirkulation ist auch CXCR4, dessen Ligand CXCL12 von mesothelialen Zellen der Bauchhöhle exprimiert wird und der die Lokalisation von B1- und B2-Zellen im Peritoneum beeinflusst [56]. CXCR4, CXCR5 und CCR7 vermitteln somit Ein- und Austritt ins Peritoneum, doch welche Chemokinrezeptoren regulieren die weiterfolgende, gerichtete Migration peritonealer Zellen in das Kolon? Neben CCR9 als wichtigsten *Homing*faktor für den Dünndarm [56, 141] wurde erst kürzlich der Chemokinrezeptor CCR6 mit einer gerichteten Migration von Immunzellen in Darm-assoziierte lymphatische Gewebe in Verbindung gebracht [97, 102].

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Peritonealhöhle von Wt-Mäusen unter homöostatischen Bedingungen eine Population von ca. 25 % $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert werden, die CCR6 exprimiert. Die durchflusszytometrische Untersuchung von $\gamma\delta$ T-Zellen der LP und des IEL des Kolons zeigte keine Expression von CCR6. CCL20 als Ligand von CCR6 wird konstitutiv vom Epithel des Kolons exprimiert und kann unter entzündlichen Stimuli hochreguliert werden [91, 142]. Für zirkulierende $CD11c^+$ und $CD11b^+$ dendritische Zellen wurde CCR6 bereits als *Homing*faktor für die intestinale Mukosa des Dünndarms beschrieben [97]. Die eigenen Ergebnisse lassen somit vermuten, dass CCR6 Teil des Rezirkulationsprozesses peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen ist und zum Egress der Zellen aus der Bauchhöhle und deren nachfolgender Einwanderung in das Kolon beiträgt, obwohl der Rezeptor nicht mehr auf $\gamma\delta$ T-Zellen des Darms nachweisbar ist. Die Expression des Liganden CCL20 und ein verändertes Zytokinmilieu im Kolon könnten die Herunterregulierung von CCR6 auf $\gamma\delta$ T-Zellen erklären. Für zirkulierende DCs wurde bereits gezeigt, dass TNF- α und IL-4 zu einer verminderten CCR6-Expression auf

der Zelloberfläche führen [143]. Nach Eintritt der $\gamma\delta$ T-Zellen in das nicht entzündete oder entzündete Kolon könnte eine differenzielle Expression des Chemokinrezeptors auch deren weiteres Rezirkulationsverhalten beeinflussen. Für unreife DCs wurde bereits beschrieben, dass diese nach LPS-Stimulation (LPS, Lipopolysaccharid) die inflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 auf der Zelloberfläche herunterregulieren und in den Reifungsprozess eintreten. Die reifenden DCs verlassen nach Antigenaufnahme schnell den Ort der Entzündung und wandern weiter zu SLO [144]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen nach Eintritt in das Kolon CCR6 herunterregulieren, um besser aus dem Kolon zu migrieren und wieder schnell in die Zirkulation einzutreten. Die Herunterregulation von CCR6 könnte andererseits aber auch für die gezielte Positionierung von $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Gewebe verantwortlich sein. Auf fetalen thymischen $V\gamma 3^+$ epidermalen $\gamma\delta$ T-Vorläuferzellen ist eine Herunterregulation von CCR6 Voraussetzung für den thymischen Egress und die gezielte Lokalisation der Zellen in der Epidermis [145].

Der Chemokinrezeptor CCR9, dessen Relevanz für die Intra- und Extravasation von IgA sezernierenden Plasmazellen, plasmazytoiden dendritischen Zellen sowie $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten in den Dün- und Dickdarm bereits von mehreren Studien bekräftigt wurde [104, 106, 141], konnte in den hier vorgestellten Ergebnissen für den Wanderungsprozess von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen ausgeschlossen werden.

Verschiedene Studien von $CCR10^{-/-}$ Mäusen lieferten Hinweise für eine Beteiligung von CCR10 am mukosalen *Homing* [109, 146]. Untersuchungen von CCR10-defizienten IgA^+ zirkulierenden Plasmazellen beispielsweise zeigten eine beeinträchtigte Migration in Dünndarm und Kolon [147]. Bei durchflusszytometrischen Analysen peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen konnte keine CCR10-Expression detektiert werden. Die Durchführung eines Chemotaxis-Assays zeigte ebenfalls kein spezifisches Migrationsverhalten von peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen gegen den CCR10 Liganden CCL28. Es konnte nur eine schwache Responsivität über dem Hintergrund detektiert werden. CCL28 wirkt nicht nur als *Chemoattractant* für zirkulierende Immunzellen, sondern wird zum Beispiel auch von Epithelzellen der Speicheldrüsen von Maus und Mensch produziert und hat dort antimikrobielle Aktivität [148]. Die Bedeutung von CCR10 für den Rezirkulationsprozess von $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums kann demzufolge auf Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse nicht abschließend bewertet werden.

Ein anderer experimenteller Ansatz sollte daher abschließend prüfen, ob das Chemokin-Chemokinrezeptorsystem allgemein von Relevanz für die gerichtete Wanderung von $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Peritonealhöhle in das entzündete Kolon ist. Splenozyten wurden mit dem Exotoxin des Bakteriums *Bordetella pertussis* inkubiert, welches die $G_{i\alpha}$ -Untereinheit $G_{i\alpha}$ -gekoppelter

Chemokinrezeptoren bindet und deren Signaltransduktionsprozesse inhibiert. Anschließend wurden die Zellen intraperitoneal injiziert. Die vergleichenden Migrationsexperimente von Pertussis-Toxin-behandelten und unbehandelten aufgereinigten Splenozyten in DSS-Empfängermäuse konnten bestätigen, dass es sich bei der Migration von CD3⁺ T-Zellen inklusive $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peritoneum in das entzündete Kolon vermutlich um einen G-Protein-gekoppelten Prozess handelt.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Lymphozyten auf ihrer Zelloberfläche ein typisches Expressionsmuster an *Homing*mediatoren zeigen, welches im Voraus die Lokalisation in ein bestimmtes Gewebe festlegt. Am gewebsspezifischen *Homing* partizipieren auch Adhäsionsmoleküle und Integrine mit ihren jeweiligen Liganden. Die gerichtete Migration von T-Zellen in die entzündete Haut beispielsweise vermitteln E-Selektin sowie P-Selektin, welche von dermalen Epithelzellen konstitutiv exprimiert werden [149]. Des Weiteren wurde auf zirkulierenden T-Gedächtniszellen CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) als ein Haut-assoziiertes *Homing*faktor identifiziert [150, 151]. Wesentlich zur Migration in Darm-assoziierte lymphatische Gewebe tragen das Integrin $\alpha 4\beta 7$ und das Adhäsionsmolekül LFA-1 bei [30]. Unter homöostatischen Bedingungen und im Mausmodell der akuten DSS-Kolitis konnte auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen eine hohe Expression von $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ nachgewiesen werden. Der Ligand von $\alpha 4\beta 7$, MadCAM-1, wird nicht nur konstitutiv vom intestinalen Epithel exprimiert [152], sondern auch während einer akuten Entzündung hochreguliert. Dies konnte bei der Analyse von IL-10^{-/-} Mäusen, die eine akute Entzündung im Kolon aufweisen, durch eine erhöhte MadCAM-1 Expression im Zäkum und Kolon bestätigt werden [153]. LFA-1 und der Aktivierungsmarker CD44 waren im naiven Zustand und während einer akuten Entzündung im Kolon auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant hochreguliert im Vergleich zu $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz. LFA-1 stärkt unter anderem die feste Adhäsion von Lymphozyten am Gefäßendothel [154]. In Interaktion mit $\alpha 4\beta 1$ unterstützen CD44 und LFA-1 die rollende Adhäsion und feste Anhaftung der Leukozyten über die Bindung an VCAM-1 während des mehrstufigen Modells der Lymphozytenmigration [30, 155].

Zusammenfassend demonstrierten die vorgestellten Untersuchungen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen mit der Expression von LFA-1, CD44 sowie der Integrine $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$ einen Phänotyp zeigten, der zur Migration in das entzündete Kolon prädisponiert. Unterstützt wird dieser Migrationsprozess peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen vermutlich durch die Expression des Chemokinrezeptors CCR6.

Eine entscheidende Beobachtung war, dass das Peritoneum die phänotypischen und funktionellen Charakteristika von $\gamma\delta$ T-Zellen modulierte. Der Transfer von aufgereinigten Wt-Splenozyten in das Peritoneum und die anschließende Reisolation nach Tagen ermöglichte es, die Änderung der Expressionslevel der oben erwähnten Adhäsionsmoleküle auf den transferierten Zellen zu analysieren. Die Expressionslevel von LFA-1 und CD44 auf reisolierten $\gamma\delta$ T-Zellen waren signifikant erhöht im Vergleich zu splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen. Das bedeutet, dass $\gamma\delta$ T-Zellen extraperitonealen Ursprungs durch *Priming* in der peritonealen Mikroumgebung einen peritonealen Phänotyp erlangen. Eine ähnliche Studie konnte für splenozytäre B2-Zellen bereits zeigen, dass diese nach intraperitonealem *Priming* über die Hochregulation von CXCR4, CXCR5 und β 7-Integrin den Phänotyp residenter, peritonealer B2-Zellen erwerben [56]. Auch peritoneale Makrophagen zeigen Plastizität. Diese adaptieren sich, obwohl bereits funktionell polarisiert, in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu an ihre Umgebung und besitzen einen reversiblen Phänotyp [156]. Eine andere Studie lieferte ebenfalls einen Hinweis für die Bedeutung des Peritoneums bei der Regulation immunologischer Vorgänge. Nach Injektion naiver bzw. reifer splenozytärer Natürlicher Killer-Zellen (NK-Zellen) in die peritoneale Mikroumgebung konnte gezeigt werden, dass das Peritoneum selektiv den Phänotyp, die Proliferation und Expansion der naiven NK-Zellen moduliert, welche einen peritonealen Phänotyp erlangen. Reife NK-Zellen hingegen verbleiben intraperitoneal ohne sich weiter zu teilen [157].

Doch was bedeutet *Priming* bzw. *Imprinting* im immunologischen Kontext? Das Wort *Imprinting* hat seinen Ursprung im angloamerikanischen Sprachgebrauch und wird unter anderem mit Vorbereitung übersetzt. Neuropsychologen verbinden den Begriff mit der Bahnung und Wirkung eines Reizes A auf die Verarbeitung des nachfolgenden Reizes B [158]. Überträgt man dieses Modell auf die immunologischen Mechanismen, die während des *Imprinting*vorgangs in der Peritonealhöhle im Mausmodell der akuten DSS-Kolitis wirken, so bedeutet das Folgendes: Das Peritoneum moduliert über die Änderung der Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren den Phänotyp und die Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen dahingehend, dass diese zu einer gerichteten und organspezifischen Migration in das entzündete und nicht entzündete Kolon fähig sind. Die peritonealen *Imprinting*vorgänge beeinflussen aber auch Differenzierung und funktionelle Aspekte von $\gamma\delta$ T-Zellen, die intraperitoneal verbleiben und die immunregulatorischen Vorgänge innerhalb der Bauchhöhle unterstützen.

4.1.2 Potentielle Mechanismen des peritonealen „Imprintings“

In der Literatur ist bisher im Allgemeinen wenig über die Bedeutung des Peritoneums bei immunologischen Prozessen und die Rolle peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen bekannt. In Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurden im Dialysat der CAPD (*continuous ambulatory peritoneal dialysis*) ca. 40 % der peritonealen Zellen als Lymphozyten identifiziert sowie ca. 2-6 % als dendritische Zellen (DC) [159]. Neben B1-Zellen [57, 160, 161] dominieren im Bauchraum die peritonealen Makrophagen $M\phi$, welche anhand ihrer Signaturzytokine in $M\phi_1$ - und $M\phi_2$ -Peritonealmakrophagen unterteilt werden. Diese Einteilung spiegelt gleichzeitig auch ihren unterschiedlichen Aktivierungsweg über T_H1 bzw. T_H2 Zellen wieder [162]. Unter dem Einfluss entzündlicher Stimuli kann sich die Zusammensetzung und Kinetik der Zellen im Peritoneum ändern. Bei einer peritonealen Infektion expandiert der Anteil der Leukozyten 100-fach, 50-90 % sind dann neutrophile Granulozyten [159]. Interessanterweise ändert nicht nur eine Infektion des Peritoneums selbst die Zellzusammensetzung, sondern auch entzündliche Reaktionen außerhalb der Bauchhöhle haben einen Einfluss auf die Komposition der residenten Zellen [163]. Betrachtet man diese Studien und die Komplexität des in immunologische Prozesse involvierten Zellnetzwerkes, stellt sich die Frage, welche Mechanismen und Zellen im Peritoneum das *Imprinting* von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren nachfolgende Migration in das Kolon vermitteln.

Denkbar ist, dass eine Aktivierung und Reifung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum zur effizienteren Wanderung in den Darm beiträgt. Die Analyse peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen ergab, dass diese signifikant höhere Expressionslevel der Aktivierungsmarker CD44, CD69 und CD25 im Vergleich zu splenozytären $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten. Die durchgeführten Experimente konnten nicht abschließend klären, ob eine Aktivierung nur das Wanderungsverhalten der $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon unterstützt oder auch lokal Differenzierungsprozesse der $\gamma\delta$ T-Zellen anregt, welche im Induktorkompartiment Peritoneum verbleiben und von dort ihre pleiotropen Effektorfunktionen während einer akuten Kolitis ausüben.

Im Allgemeinen ist eine effiziente T-Zellaktivierung Voraussetzung für die Induktion eines Darm-assoziierten Phänotyps. Die Kostimulation von $CD8^+$ T-Zellen mit DC aus Peyer-Plaques führte zu einer Hochregulation von CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ auf den $CD8^+$ T-Zellen, welche somit einen Darm-Tropismus erlangen [164]. Ähnliches konnte für Antigen-spezifische $CD4^+$ T-Zellen gezeigt werden, welche nach adoptivem Transfer und *Priming* im mLN eine erhöhte Oberflächenexpression von $\alpha 4\beta 7$ sowie eine erhöhte Responsivität gegen TECK, den Liganden von CCR9, zeigen. $CD4^+$ T-Zellen hingegen, die im subkutanen peripheren Lymphknoten aktiviert wurden, exprimieren P-Selektin-Ligand, welcher zur Migration in die Haut prädisponiert [165, 166]. Diese Untersuchungen unterstreichen sowohl die Bedeutung der

Mikroumgebung sekundär lymphatischer Organe für das selektive Erlangen eines gewebspezifischen Phänotyps, als auch die außerordentliche Rolle von Antigen-präsentierenden DC beim *Priming* von Immunzellen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen nach Verlassen der Bauchhöhle auf ihrem Weg zum Kolon im mLN oder den *milky spots* des Omentum majus weiteren *Imprinting*mechanismen unterliegen. Die residenten peritonealen DC werden vermutlich ebenfalls einen wesentlichen Beitrag zu diesem Vorgang leisten. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass DC in bimodaler Weise das T-Zell-*Homing* unterstützen. Zum einen können sie selbst lösliche Faktoren wie Retinolsäure produzieren [167], welches wichtig für den Darm-Tropismus von Zellen ist. Andererseits können DC beispielsweise Moleküle wie Retinolsäure, die von SIEC (*small intestinal epithelial cells*) produziert werden, auf T-Zellen übertragen und somit deren Darm-*Homing* fördern [168]. Die Relevanz von Retinolsäure für das *Imprinting* eines Darm-assoziierten Phänotyps haben bereits mehrere Studien belegt. So fördert die Produktion von Retinolsäure der DC des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes das *Homing* zirkulierender B-Zellen und IgA-produzierender Plasmazellen in den Dünndarm [169]. Es bleibt allerdings offen, ob das *Imprinting* von B-Zellen [56] und $\gamma\delta$ T-Zellen und deren anschließende Migration in das Kolon auch im Peritoneum durch Retinolsäure vermittelt werden.

Des Weiteren kann als mechanistische Grundlage des *Imprinting* der Einfluss kostimulatorischer Moleküle wie CD28 oder ICOS nicht ausgeschlossen werden [30]. Die Analyse der Genexpressionslevel ergab eine zweifache Hochregulation von ICOS auf $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums im Vergleich zur Milz, was diese Hypothese bestätigt. Inzwischen konnte auch bewiesen werden, dass Zytokine einen gewebspezifischen Phänotyp prägen können. IL-4 zum Beispiel instruiert über Retinolsäure-produzierende DC im mLN naive CD4⁺ T-Zellen zur Expression von CCR9, einen der wichtigsten *Homing*rezeptoren für den Dünndarm [105, 170]. Eine Übersicht über die potentiellen Mechanismen des peritonealen *Imprintings* gibt Abb. 28.

Peritoneum

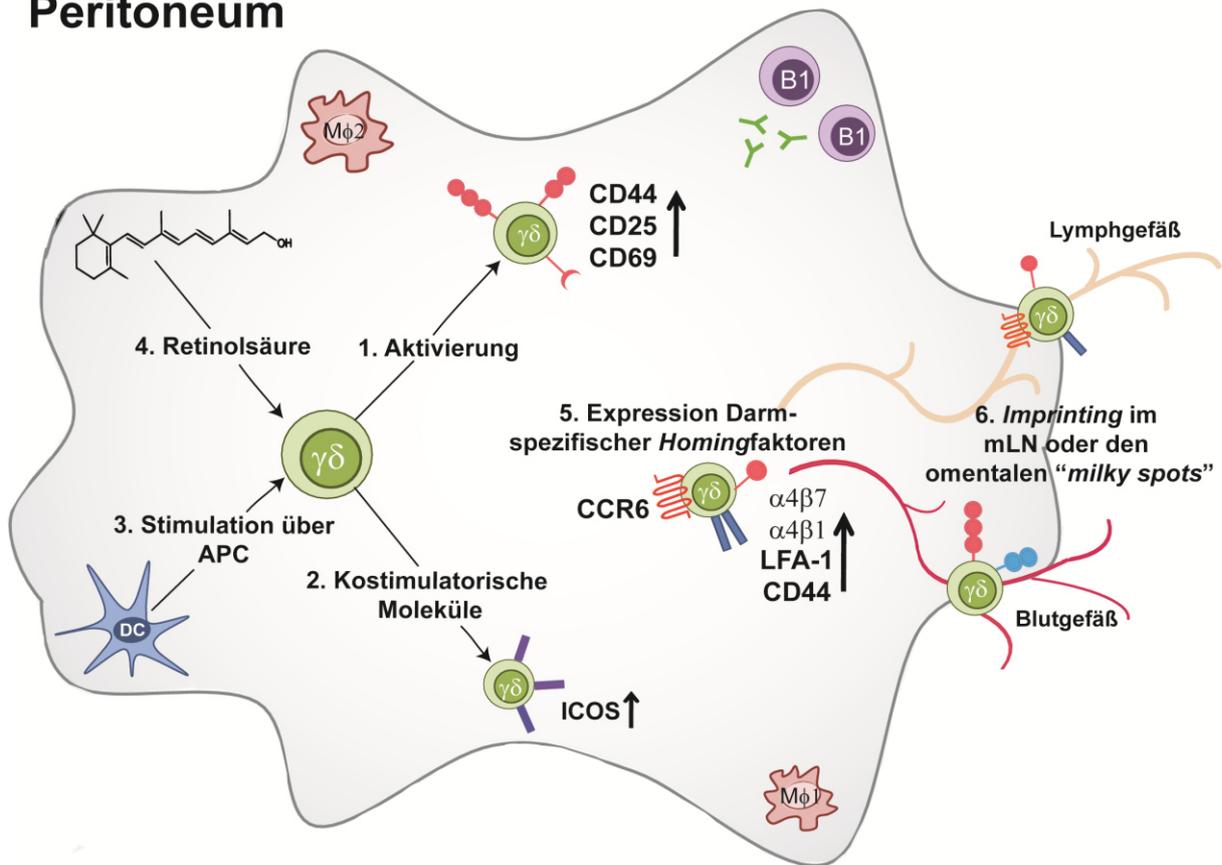


Abb. 28: Modell der potentiellen Mechanismen des peritonealen *Imprintings*

Vereinfachte schematische Darstellung der mechanistischen Grundlagen des *Imprinting*vorgangs von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum. Das *Priming* und die Migration peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon wird über die Expression charakteristischer Aktivierungsmarker CD44, CD25 und CD69 unterstützt (1). Auf transkriptioneller Ebene wird über die Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls ICOS (*Inducible T-cell costimulator*) das peritoneale *Imprinting* von $\gamma\delta$ T-Zellen gefördert (2). Über die Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, peritonealen $M\phi_1$ - und $M\phi_2$ -Makrophagen oder B1-Zellen erhalten $\gamma\delta$ T-Zellen Signale, die zur Hochregulation und Expression Darm-spezifischer *Homing*rezeptoren beitragen (3). Antigen-präsentierende Zellen können über Retinolsäure ebenfalls den Darm-Tropismus der residenten $\gamma\delta$ T-Zellen unterstützen (4). Das peritoneale *Imprinting* führt zur Hochregulation Darm-spezifischer *Homing*rezeptoren und Adhäsionsmoleküle CCR6, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$, LFA-1 und CD44 auf $\gamma\delta$ T-Zellen (5), die nach Verlassen der Bauchhöhle über Blut- und Lymphgefäße auf ihrem Migrationsweg in das entzündete Kolon in den *milky spots* des Omentum majus oder dem mesenterialen Lymphknoten (mLN) weiteren *Imprinting*mechanismen unterliegen (6).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die peritoneale Mikroumgebung zum *Imprinting* von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Migration in das Kolon beiträgt. Dies ist gleichzeitig Kennzeichen ihrer peripheren Plastizität und der Reversibilität ihres Phänotyps. Mechanistisch können eine lokale Aktivierung peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen, die Expression kostimulatorischer Moleküle und Darm-spezifischer *Homing*rezeptoren CCR6, CD44, LFA-1, $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$ zur Induktion und

dem Prozess der Migration beitragen. Vermutlich sind auch das lokale Zytokinmilieu, Zell-Zell-Interaktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen wie peritonealen DC und Makrophagen sowie Dosis und Persistenz von Antigenstimuli in diesen Prozess involviert.

4.1.3 $\gamma\delta$ T-Zell-Effektorfunktionen – zwischen intrathymischer Programmierung und funktioneller Plastizität in der Peripherie

Im Gegensatz zu konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen, die zur Initiation einer effektiven Immunantwort die Präsentation eines Antigens über eine spezialisierte Antigen-präsentierende Zelle benötigen, besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen die Fähigkeit, dieses auch unabhängig von Antigenprozessierung und Antigenpräsentation zu erkennen [171]. Dies ermöglicht ihnen die schnelle Induktion eines breiten Spektrums an Effektorfunktionen und die nachfolgende Beseitigung von Pathogenen. Ein weiteres Unterscheidungskriterium von $\gamma\delta$ und $\alpha\beta$ T-Zellen liegt im Erlangen der spezifischen funktionalen Kompetenz. $CD4^+$ T-Zellen beispielsweise entwickeln sich in der Peripherie in Abhängigkeit von Zytokinen und löslichen Faktoren in die distinkten Effektorpopulationen der T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_{FH} -Zellen und regulatorischen T-Zellen. Für IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta T17$) hingegen wird angenommen, dass ihre Funktionalität bereits intrathymisch determiniert wird und einem komplexen transkriptionellen Programm unterliegt [120, 121, 172, 173]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Transferexperimente von Wt-Splenozyten in das Peritoneum und das anschließende *Priming* hingegen beweisen die funktionelle Plastizität von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Peripherie. Es stellen sich daher zunächst folgende Fragen: Inwiefern lässt sich die intrathymische Vorprägung in der Peripherie noch modulieren und welche Faktoren nehmen Einfluss darauf? Unterliegen alle $\gamma\delta$ T-Zellen einer Programmierung oder existieren auch Populationen, die den Thymus *naiv* verlassen um peripher funktionale Kompetenz zu erlangen? Bei der T-Zellentwicklung im Thymus werden die Thymozyten im frühen Entwicklungsstadium über die Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 in doppelpositive (DP) und doppeltnegative (DN) unterteilt. Die DN-Thymozyten können anhand der Expression von CD44 und CD25 in vier aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien DN1, DN2, DN3 und DN4 unterteilt werden [174, 175]. Im DN2 und DN3 Stadium können die T-Zellprogenitoren entweder einen $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor arrangieren, was demzufolge die Entwicklung in eine $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zelle festlegt [176]. Das klassische Modell der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptorarrangements im embryonalen Thymus geht dann von einem wellenförmigen Prozess aus. Demnach verlassen im frühen fetalen Stadium präferiert $V\gamma5^+$, $V\gamma4^+$ und $V\gamma6^+$ $\gamma\delta$ T-Zellprogenitoren den Thymus in die Peripherie, später dominieren dann $V\gamma1^+$ und $V\gamma4^+$ Thymozyten [177, 178]. Bei $V\gamma7^+$ intestinalen intraepithelialen Lymphozyten geht man von einem Thymus-unabhängigen

Differenzierungsprozess aus [179]. Das Modell der funktionellen Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen wird unter anderem von Born und Kollegen [24] um zwei Komponenten erweitert: Der Programmierung im Thymus im ersten Schritt folgen weitere Differenzierungsprozesse in SLO, die dann im letzten Schritt in der Peripherie spezialisiert und adaptiert werden. Die Hypothese von Hayes und Laird [173] zur dreistufigen Entwicklung der $\gamma\delta$ T17 ist divers: Sie gehen primär von der Entwicklung einer $\gamma\delta$ T17-Vorläuferzelle im Thymus aus. Dies wird unter anderem von einem komplexen Gennetzwerk reguliert, welches beispielsweise den Lymphotoxin- β -Rezeptor-, den Notch- und den TGF- β -Signalweg inkludiert. Die $\gamma\delta$ T17-Vorläuferzelle erfährt im zweiten Schritt eine weitere intrathymische Reifung und wird dann konsekutiv peripher moduliert [173]. Erste Untersuchungen thymischer $\gamma\delta$ T-Zellen konnten keine IL-17-Produktion detektieren, was indiziert, dass $\gamma\delta$ T-Zellen diese Funktion erst in der Peripherie erlangen [116]. Hingegen zeigte eine erst kürzlich veröffentlichte Studie wiederum, dass sich $\gamma\delta$ T17 vor der Geburt im Thymus entwickeln und in adulten Mäusen als langlebige, selbst-erneuernde Population persistieren [120]. Interessanterweise scheint auch eine intrathymische Ligandenexposition einen Einfluss auf die Generierung der $\gamma\delta$ T-Zelleffektorpopulationen zu haben. Folglich produzieren vermehrt Liganden-naive Zellen IL-17, die Antigen-erfahrenen Zellen bevorzugt $\text{IFN}\gamma$. Essentiell ist auch, dass in der Peripherie die Majorität der Antigen-naiven Zellen, die $\gamma\delta$ T17, aufrechterhalten wird [28].

Die Analyse peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen ergab, dass ca. 40 % IL-17 produzierten, wobei dieser Anteil während einer Entzündung im Kolon signifikant expandierte. Ein ähnlicher Prozentsatz der $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert den Differenzierungsmarker CD27 auf der Oberfläche. Dies lässt vermuten, dass CD27 zur Unterscheidung Zytokin-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen dient. Demnach wären $\gamma\delta$ T17 CD27⁻, die $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten ($\gamma\delta$ TIN γ) CD27⁺. Bekräftigt wird diese Hypothese dadurch, dass CD27 bereits als intrathymische Determinante festlegt, ob sich $\gamma\delta$ T-Zellen in CD27⁺ $\text{IFN}\gamma$ ⁺- oder CD27⁻ IL-17⁺-Produzenten entwickeln [27]. Funktionell ist CD27 nicht in die IL-17-Produktion involviert.

Neben CD27 wird auch CCR6 in der Literatur zur Unterscheidung Zytokin-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen herangezogen. $\gamma\delta$ T17 sind folglich CCR6⁺, $\gamma\delta$ TIN γ CCR6⁻ [26]. Die durchgeführten Experimente konnten jedoch zeigen, dass nur ca. 15-20 % der peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen, obwohl IL-17-Produzenten, CCR6 exprimierten. Es existieren demnach weit mehr $\gamma\delta$ T17 in der Peritonealhöhle, die nicht den in der Literatur beschriebenen charakteristischen Marker CCR6 exprimieren [26]. Die Analyse von CCR6^{-/-} Mäusen ergab überraschenderweise einen signifikant erhöhten Anteil an $\gamma\delta$ T17 im Vergleich zu Wt-Tieren. Somit kann eine CCR6-Expression nicht

funktionell mit einer IL-17 Produktion korreliert werden. Es könnte sein, dass CCR6-defiziente $\gamma\delta$ T17 schlechter in den Darm migrieren und deshalb prozentual in der Peritonealhöhle akkumulieren. Analysen von CCR6-defizienten Mäusen bestätigten ebenfalls, dass eine CCR6-Expression nicht für das *in vitro* und *in vivo Priming* und die Differenzierung von T_H-17 Zellen notwendig ist [180].

Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine Konversion CD27⁺ $\gamma\delta$ TINF γ in IL-17-Produzenten nicht möglich ist [27]. Dies bekräftigt die Annahme, dass $\gamma\delta$ T17 im Thymus funktionell festgelegt werden und dieser Phänotyp in der Peripherie stabil bleibt. Dem widersprechen Analysen dieser Arbeit, die zeigten, dass splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen nach Transfer in das Peritoneum ihren Phänotyp über die Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren an die Mikroumgebung adaptieren und somit gleichzeitig auch ihre funktionellen Charakteristika änderten. Für die peritoneale Mikroumgebung und die residenten lokalen $\gamma\delta$ T-Zellen im Modell der akuten Kolitis könnte man somit folgende Hypothese aufstellen: Im Peritoneum ist die $\gamma\delta$ T-Zellkomposition dichotom: Einerseits erreichen das Peritoneum präferiert $\gamma\delta$ T-Vorläuferzellen aus dem Thymus mit einem vorprogrammierten $\gamma\delta$ T17-Phänotyp, die auch ohne eine spezifische Immunantwort IL-17 produzieren können. Sie zeigen *innate-like* Charakteristika und können schnell eine IL-17-Antwort vermitteln. Der zweite Teil der $\gamma\delta$ T-Zellen wird über die lokal vermehrte Antigenexposition während einer akuten Entzündung im Darm induziert. Die Antigene triggern über den T-Zellrezeptor die Aktivierung der lokalen $\gamma\delta$ T-Zellen, die intraperitoneal in $\gamma\delta$ T17-Effektorzellen differenzieren und eher der adaptiven Immunantwort (*adaptive-like* $\gamma\delta$ T-Zellen) zuzuordnen sind [25, 181].

Unterstützen könnten den Differenzierungsprozess in $\gamma\delta$ T17 im Peritoneum sowohl das lokale Zytokinmilieu als auch das Einschalten transkriptioneller Programme. Bestärkt wird diese Annahme zum einen dadurch, dass sich $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums auf molekularer Ebene stark von denen der Milz unterscheiden. Die Analyse der Genexpressionslevel ergab, dass auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu splenozytären die Transkriptionsfaktoren SOCS-1, ROR γ t, ROR α , c-Maf und ICOS hochreguliert waren. Diese sind in die Entwicklung und Aufrechterhaltung von T_H17-Zellen einbezogen [11, 122, 126, 131, 182], was demzufolge den T_H17-Phänotyp der $\gamma\delta$ T-Zellen auf molekularer Ebene untermauert. Auch in anderen Studien konnte bestätigt werden, dass die peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen die für IL-17-Produzenten und T_H17-Zellen charakteristischen Marker ROR γ t und CCR6 exprimieren [11, 26]. Es ist somit denkbar, dass zirkulierende $\gamma\delta$ T-Zellen im peritonealen Mikromilieu durch transkriptionelle und phänotypische Veränderungen einem *Imprinting* zu IL-17-Produzenten unterliegen.

Zusammenfassend belegen die vorgestellten Daten, dass unter einer akuten Entzündung im Kolon peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen vermehrt zur Produktion von IL-17 angeregt werden. Diese konnten als IL-17⁺ CD27⁻ CCR6⁺ ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert werden. Wahrscheinlich wird ein Teil von ihnen bereits im Thymus zu IL-17-Produzenten determiniert und lokalisiert dann im Peritoneum. Auszuschließen ist aber nicht, dass unter einer akuten Kolitis durch die veränderte peritoneale Mikroumgebung neue IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen generiert werden.

4.2 Das Peritoneum unterstützt Darm-assoziierte Immunantworten während einer akuten Kolitis

4.2.1 Gerichtete Migration peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon

Die dynamische und synergistische Interaktion von angeborener und adaptiver Immunität ist essentiell für die Aufrechterhaltung der mukosalen Barriere im Kolon. Eine zentrale Rolle bei diesem Prozess übernehmen T-Zellen, von denen insbesondere die T_H-17-Zellen und die IL-17-produzierenden *innate-like lymphocytes* im Fokus der aktuellen Wissenschaft stehen. Zelluläres Target des Zytokins IL-17 sind unter anderem epitheliale Zellen [183-185], Neutrophile [184], B-Zellen [185] und Monozyten/Makrophagen [186], die nach Aktivierung mutualistisch die intestinale Integrität aufrechterhalten und das Eindringen kommensaler Mikroorganismen verhindern. Aus der Gruppe der *innate-like lymphocytes* sind $\gamma\delta$ T-Zellen oft die Hauptproduzenten von IL-17.

Im Peritoneum von Wt-Mäusen wurden nach *in vitro* Stimulation 40 % der $\gamma\delta$ T-Zellen als ROR γ t⁺ IL-17 Produzenten ($\gamma\delta$ T17) identifiziert, wobei der Anteil während einer akuten Entzündung im Kolon unter DSS-Gabe auf ca. 75 % signifikant anstieg. Die Transferversuche lieferten einen Hinweis für das peritoneale *Imprinting* von $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Erlangen eines Darm-assoziierten Phänotyps. Um zu untersuchen, ob $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums in das entzündete Kolon migrieren, wurden adoptive Zelltransferexperimente mit angereicherten CD3⁺ T-Zellen in DSS-Empfängertiere durchgeführt. Die Reisolation der Zellen aus der LP und dem IEL des Darms und die anschließende Analyse erfolgte 24 bzw. 36 Std. nach Transfer. Die durchgeführten Transferexperimente im Mausmodell der akuten DSS-Kolitis konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals demonstrieren, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon migrieren. In der LP und im IEL konnten 24 Std. nach Transfer CD45.2^{high} B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert werden. Der Anteil transferierter $\gamma\delta$ T-Zellen an gesamtisolierten Lymphozyten in beiden Kompartimenten fluktuierte mit 5-15 % deutlich. Auch nach 36 Std. konnte im IEL und in der LP des Kolons eine Population transferierter $\gamma\delta$ T-Zellen

detektiert werden, wobei hier im IEL der Anteil von CD45.2^{high} B220⁻ CD3⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen mit 5-25 % höher war als in der LP, wo nur ca. 5 % dieser $\gamma\delta$ T-Zellen zu finden waren. Unterschiede in Bezug auf Geschlecht und Gewicht der Mäuse in den einzelnen Versuchsansätzen könnten die Schwankungen in den Experimenten erklären. Auffällig war auch, dass weibliche und männliche Mäuse ein anderes Trinkverhalten hatten, was zu Unterschieden in der zeitlichen Initiation der Kolitis, deren Verlauf und Ausprägungsgrad führen kann. Das wiederum nimmt Einfluss auf das Rekrutierungsverhalten von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Peritoneum und könnte somit ein weiterer Grund für die Variation der Ergebnisse der Transferexperimente sein.

Der hohe Anteil an $\gamma\delta$ T17 im Peritoneum während einer akuten Kolitis legt die Vermutung nahe, dass diese Population präferiert in den entzündeten Darm migriert. Erste Hinweise für die Rekrutierung von immunregulatorischen Zellen aus dem Peritoneum während einer akuten Kolitis lieferte eine Studie über B-Zellen. Diese zeigten nach intraperitonealem Transfer eine Hochregulation des Darm-spezifischen *Homing*markers β 7-Integrin und eine verbesserte Migration in die LP des Dünndarms [56]. Im Modell der chronischen DSS-Kolitis konnte beobachtet werden, dass T_H17-Zellen vermehrt in das entzündete Kolon rekrutiert wurden [187]. Analysen der Seren von Mäusen mit einer akuten Entzündung im Kolon nach DSS-Gabe ergaben ebenfalls ein Bias zur T_H17-Antwort in der frühen Phase der Kolitis [182]. Für $\gamma\delta$ T-Zellen des LN konnte gezeigt werden, dass diese bereits vier Stunden nach Triggerung durch IL-1 und IL-23 zur IL-17-Produktion angeregt wurden und somit im Gegensatz zu naiven CD4⁺ T-Zellen, die erst nach drei bis fünf Tagen in T_H17-Effektorzellen differenzierten, früh eine Immunantwort initiierten [73, 74]. Die hier vorgestellten Ergebnisse beweisen ebenfalls, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen die frühe Phase der Immunabwehr während einer akuten Kolitis regulieren können, da sie bereits 24 bzw. 36 Std. nach Transfer im entzündeten Kolon nachweisbar waren. Es konnte jedoch abschließend nicht geklärt werden, welche Subpopulation, ob die IL17⁻ oder IL17⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen, in den Darm einwanderten, da die Zahl transferierbarer $\gamma\delta$ T-Zellsplenozyten limitiert war. Offen bleibt auch, welche konkrete Rezirkulationsroute $\gamma\delta$ T-Zellen nach Verlassen des Peritoneums nehmen, wie hoch die Retention an Zellen in anderen Kompartimenten auf dem Weg in das Kolon ist und wie viele Zellen nach intraperitonealer (i.p.) Injektion in Apoptose gehen. Eine elegante Herangehensweise zur Beantwortung dieser Frage wäre die *Intravital-Two-Photon*-Mikroskopie i.p. injizierter Fluoreszenzfarbstoff-gelabelter $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon. Für $\gamma\delta$ T-Zellen des IEL im Dünndarm wurde mithilfe des *live imaging* bereits eine dynamische, Okkludin-abhängige Migration sowohl innerhalb des IEL selbst als auch im Austausch mit der LP gezeigt [188]. Diese Studie widerlegt das bisher geltende Paradigma in Bezug auf $\gamma\delta$ IELs,

wonach diese im Gewebe des Dünndarms sesshaft sind, eine geringe basale Motilität zeigen und sich nicht mit Zellen der Peripherie austauschen [189-191]. Interessanterweise besitzen auch $\gamma\delta$ T-Zellen peritonealen Ursprungs im Kolon eine gewisse Dynamik. Die Zeitkinetik dieser Arbeit zeigte, dass 24 Std. nach Transfer der $\gamma\delta$ T-Zellanteil in der LP mit ca. 10 % höher war als im IEL. Nach 36 Std. hingegen war das Gegenteil zu beobachten: der Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im IEL lag mit ca. 5-25 % höher als in der LP mit ca. 5 %. Dies lässt einen Austausch zwischen der LP und dem IEL vermuten. In Übereinstimmung mit der oben erwähnten Studie über die hoch mobile $\gamma\delta$ T-Zellpopulation im Dünndarm [188] lieferten die eigenen Ergebnisse neue Aspekte für das *Homing* und die Rezirkulation von $\gamma\delta$ T-Zellen in Darm-assoziierten lymphatischen Geweben.

Die durchgeführten Transferexperimente erbrachten den Beweis für die zentrale Rolle des Peritoneums bei der Unterstützung Darm-assoziiierter Immunantworten während einer akuten Kolitis. Für peritoneale B-Zellen bestätigten Untersuchungen bereits eine effizientere Migration in die intestinale Mukosa des Dünndarms über die intraperitoneale (i.p.) Route im Vergleich zum *Homing* über den intravenösen (i.v.) Weg [56]. Es stellte sich daher die Frage, ob Gleiches auch für peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zutrifft. Es erfolgte zunächst die i.p. Applikation MACS-aufgereinigter Splenozyten, 30 Minuten danach die i.v. Injektion rot markierter Splenozyten. Nach Kurzzeitmigration von 24 Stunden wurde die Analyse der LP und des IEL durchgeführt. Diese ergab für die LP, dass im Durchschnitt ca. 70 % (\pm 13 %) der insgesamt rekrutierten Zellen über die peritoneale Route das Kolon erreicht hatten, über den Blutstrom waren es durchschnittlich nur ca. 30 % (\pm 13 %). Auch im IEL war der Anteil peritoneal rekrutierter Zellen mit ca. 70 % signifikant höher als der Anteil venös rekrutierter Zellen mit nur 25-40 %. Die Schwankungen in den Experimenten können ebenfalls auf oben genannte Gründe zurückzuführen sein. Somit konnten die Transferexperimente untermauern, dass das Migrationsverhalten $CD3^+$ T-Zellen inklusive $\gamma\delta$ T-Zellen über das Peritoneum in das Kolon ähnlich effizient ist wie das *Homing* über den venösen Weg. Für das IEL war die peritoneale Route sogar effektiver. $\gamma\delta$ T-Zellen, die eine intraperitoneale Aktivierung durchlaufen, werden somit im Peritoneum zur gerichteten Wanderung in das Kolon instruiert. Eine modellhafte Darstellung der Interaktion und Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in Peritoneum und Kolon zeigt Abb. 29.

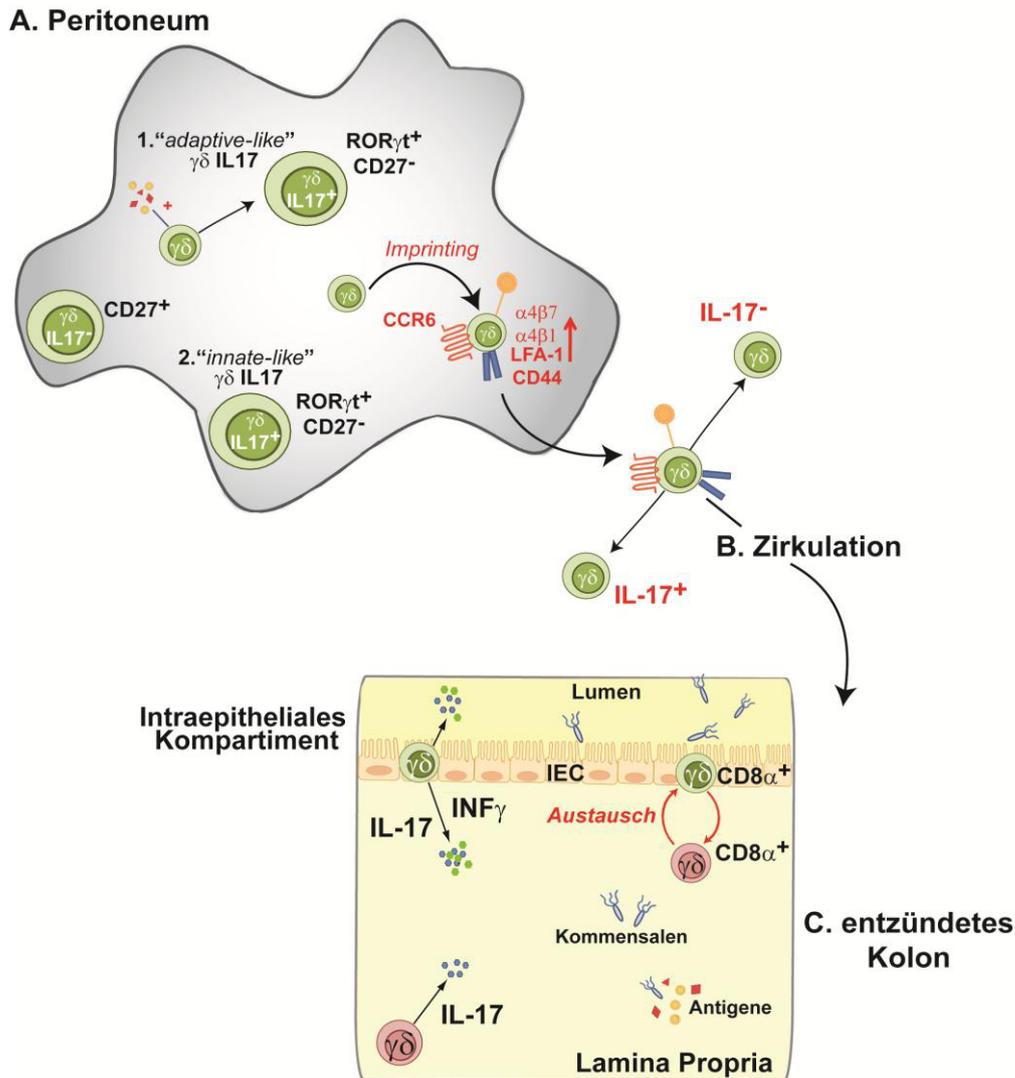


Abb. 29: Modell der Interaktion und Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in Peritoneum und Kolon

(A) Vereinfachtes Schema der potentiellen Interaktions- und Migrationsmechanismen von $\gamma\delta$ T-Zellen in Peritoneum und entzündetem Kolon. Neben IL17⁻ CD27⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen existieren intraperitoneal zwei distinkte IL17-produzierende Populationen, die adaptives und erworbenes Immunsystem widerspiegeln: die ROR γ t⁺ CD27⁻ „adaptive-like“ $\gamma\delta$ T-Zellen, die über lokale Antigenstimuli induziert werden und erst im Peritoneum in IL-17-Effektorzellen differenzieren. Daneben existieren „innate-like“ ROR γ t⁺ CD27⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen, die den Thymus bereits vorprogrammiert als IL-17 Produzenten verlassen. Über Mechanismen des peritonealen *Imprintings* erlangen $\gamma\delta$ T-Zellen einen Darm-assoziierten Phänotyp. (B) Sowohl IL17⁻ als auch IL17⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen treten in die Zirkulation ein und wandern über die Expression charakteristischer *Homing*rezeptoren in die LP und das IEL des entzündeten Kolons (C). Hier zeigen sie über die CD8 α -Expression in beiden Kompartimenten einen aktivierten Phänotyp. Die IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen sitzen präferiert in der LP, die IFN γ Produzenten im IEL, wobei ein Austausch zwischen beiden Kompartimenten stattfindet. Aktivierungs-, Differenzierungs- und Interaktionsprozesse der residenten $\gamma\delta$ T-Zellen werden durch lokale Antigenstimuli, intestinale epitheliale Zellen (IEC) und Kommensalen, die über die gestörte intestinale Integrität während einer akuten Kolitis auch in LP und IEL eintreten, unterstützt und bestimmt.

Zusammenfassend demonstrierten die hier vorgestellten Analysen erstmals, dass $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums während einer akuten Entzündung in das Kolon einwandern, um lokal ihre pleiotropen Effektorfunktionen auszuüben. Die Effektivität der Migration über die intraperitoneale Route ist vergleichbar mit dem *Homing* über den venösen Weg, für das intraepitheliale Kompartiment des Kolons sogar effizienter. Die Expression der Darm-spezifischen *Homing*rezeptoren CD44, LFA-1, $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$ auf $\gamma\delta$ T-Zellen der Bauchhöhle unterstützt diesen Rekrutierungsprozess.

4.2.2 Rolle von $\gamma\delta$ T-Zellen bei einer akuten Kolitis – Immunregulatoren oder Entzündungsmediatoren?

Die Bedeutung von IL-17 und die Protektivität von $\gamma\delta$ T-Zellen während akuter und chronischer Entzündungsprozesse werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Mausmodelle der akuten DSS oder TNBS-vermittelten Kolitis lieferten einerseits Hinweise für die regulatorischen Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen in der intestinalen Mukosa. Durch Transfer von $\gamma\delta$ IELs des Dünndarms in $\gamma\delta^{-/-}$ Mäuse konnte die TNBS-induzierte Kolitis über TGF- β -vermittelte Suppression der T_H1-Immunantwort herunterreguliert werden [192]. Im Allgemeinen zeigen $\gamma\delta^{-/-}$ Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber DSS und TNBS [193, 194] im Vergleich zu Wt-Mäusen, weil insbesondere die Regeneration des Epithels nach Absetzen des DSS bei $\gamma\delta^{-/-}$ Mäusen beeinträchtigt ist. Die $\gamma\delta$ IELs lokalisieren vermehrt in entzündeten Regionen des Kolons und produzieren dort KGF (*keratinocyte growth factor*), der die epitheliale Zellproliferation anregt [193]. Bei der Re-Etablierung der epithelialen Integrität konnte der positive Effekt von KGF ebenfalls im Modell der DSS-Kolitis sowie der CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zelltransfer-Kolitis bestätigt werden [195]. Auch DETC (*dendritic epidermeal T-cells*), die $\gamma\delta$ T-Zellen der Epidermis der Haut, regen über KGF die lokale Hyaluronproduktion an, welches die Struktur des Bindegewebes festigt und Zellmigration unterstützt [196].

In vielen Infektionsmodellen wurde die protektive Rolle IL-17-produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen, auch der des Peritoneums, bereits beschrieben [197]. Im Modell der CD45RB^{hi} Transfer-Kolitis konnte bei Transfer IL-17-defizienter Splenozyten ein aggressiverer Krankheitsverlauf (*wasting disease*) in Mäusen beobachtet werden im Vergleich zum Transfer IL-17-produzierender Splenozyten, was ebenfalls die schützende Wirkung von IL-17 im Rahmen einer Kolitis bestärkt [198]. Verschiedene Studien weisen hingegen auf, dass $\gamma\delta$ T17 an der Induktion und Exazerbation von Entzündungen im Darm sowie der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Im murinen Modell der CIA (*collagen-induced arthritis*) konnte nach Depletion V γ 4⁺ IL17⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen eine verminderte Entzündung der Gelenke in der Histologie festgestellt

werden [199]. Der Transfer CCR6⁺ IL-17⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen in $\gamma\delta^{-/-}$ Mäuse förderte die Kolutogenität von CD4⁺ T-Zellen und deren T_H17-Differenzierung. Bei Kotransfer beider Zellpopulationen in Mäuse deuteten sowohl die Histologie als auch die Analyse des Gewichtsverlaufs auf eine stärkere Kolutis hin [200]. Auch in TCR $\beta\alpha^{-/-}$ Mäusen exazerbieren $\gamma\delta$ T-Zellen nach Transfer die Kolutis [119]. Eine Untersuchung von *Cd4-Cre*-Mäusen konnte zeigen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen von Kommensalen aktiviert werden und eine spontane Kolutis induzieren, wenn die regulatorischen Mechanismen der Tregs inhibiert sind. Des Weiteren konnte in dieser Studie belegt werden, dass im Kolon die $\gamma\delta$ T-Zellen des IEL im Vergleich zu denen der LP eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 zeigen. Interessanterweise expandierten die $\gamma\delta$ T17 im IEL, aber nicht in der LP [118]. Die adoptiven Zelltransferexperimente dieser Arbeit ergaben, dass der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen im IEL nach 36 Std. höher war als nach 24 Std. Es ist daher wahrscheinlich, dass $\gamma\delta$ T-Zellen des Peritoneums während einer akuten Kolutis zuerst die LP erreichen und dann ins IEL wandern, um dort IL-17 zu produzieren. Der Austausch zwischen beiden Kompartimenten ist nicht sicher auszuschließen. Die Expression von CD69 auf ca. 25 % peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen könnte mit der CD69-Expression der $\gamma\delta$ IELs korrelieren [118] und folglich die verbesserte Migration in dieses Kompartiment unterstützen. Was die IL-17-Produktion betrifft, so ergaben die *in vitro* Stimulationsexperimente, dass der Anteil der $\gamma\delta$ T17 in der LP signifikant höher war als im IEL. Das Ergebnis unterstreicht die bisher gültige Annahme, dass die $\gamma\delta$ T17 vermehrt in der LP und die $\gamma\delta$ IFN γ eher im IEL siedeln [11, 25]. Die Produktion von IL-17 der $\gamma\delta$ T-Zellen im IEL und der LP bleibt dennoch kontrovers, da Park und Kollegen die Expansion von $\gamma\delta$ T17 im IEL, aber nicht in der LP beschreiben [118].

Überraschenderweise konnte der T-Zellkorezeptor CD8 α ⁺ in beiden Kompartimenten des Kolons auf bis zu ca. 50 % $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert werden, obwohl dieser bisher nur auf $\gamma\delta$ T-Zellen des IEL detektiert wurde [29, 118]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen somit vermuten, dass $\gamma\delta$ T-Zellen in beiden Kompartimenten des Kolons aktiviert sind und ihr immunoregulatorisches Potential über die Expression des kostimulatorischen CD8 α -Rezeptors verstärkt wird [201]. Die CD8 α -Expression kann jedoch nicht eindeutig mit der IL-17-Produktion korreliert werden, da $\gamma\delta$ T17 im IEL und in der LP CD8 α^{-} sind.

Bei der Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon unter einer akuten Kolutis spielen ebenfalls die intestinalen kommensalen Mikroorganismen eine Rolle [202]. Der entscheidende Unterschied zwischen einem Pathogen und einem Kommensalen ist, dass letzterer nicht mukosale Abwehrmechanismen überwinden muss, um sich in einer Nische des Epithels zu entwickeln [63]. Analysen von $\gamma\delta$ IELs ergaben, dass eine DSS-Kolutis ein komplexes transkriptionelles Programm in $\gamma\delta$ IELs anregt, welches beispielsweise die Expression von KGF,

inflammatorischer Zytokine und chemotaktischer Faktoren inkludiert. Dieser Prozess hängt von Kommensalen ab, sodass man das Interaktionsmodell folgendermaßen beschreiben könnte: $\gamma\delta$ IELs benötigen einerseits die Stimuli kommensaler Mikroorganismen zur Induktion antibakterieller Abwehr, andererseits verhindern sie dadurch gleichzeitig auch die vermehrte Penetration von Kommensalen ins Epithel während einer akuten Entzündung. Als weitere beteiligte Interaktionspartner vermitteln die intestinalen epithelialen Zellen Signale an $\gamma\delta$ IELs, welche wiederum zur Produktion antimikrobieller Peptide angeregt werden [203, 204] (Abb. 29). Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen in das Kolon migrieren und vor Ort Darm-assoziierte Immunantworten im Rahmen einer akuten Entzündung unterstützen könnten. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass peripher zirkulierende $\gamma\delta$ T-Zellen plastizitär sind und sich funktionell an ihre Mikroumgebung adaptieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten dabei erstmalig die elementare Rolle des Peritoneums bei den immunmodulatorischen und regulatorischen Prozessen des *Imprintings* von $\gamma\delta$ T-Zellen demonstrieren.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas, A., A.H. Lichtman, and S. Pillai, Basic Immunology. 4 ed. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 2012:Saunders.336.
2. Murphy, K., Janeway's Immunobiology. 8 ed. Immunobiology: The Immune System (Janeway).2011:Garland Science.888.
3. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 2012;7:61-98.
4. Banchereau, J. and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
5. Clevers, H., Alcaron, B., Wileman, T., Terhorst, B., The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988;6:629-62.
6. Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe A.I., von Boehmer, H., alphabeta versus gammadelta fate choice: counting the T-cell lineages at the branch point. *Immunol Rev* 2010;238:169-81.
7. Lord, S.J., Rajotte, R.V., Korbitt, G.S., Bleackley, R.C., Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* 2003;193:31-8.
8. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-89.
9. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098-102.
10. Glimcher, L.H. and K.M. Murphy, Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000;14:1693-711.
11. Ivanov, I.I, McKenzie, B.S., Zhou, L., et al., The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-33.
12. Yang, X.O., Pappo, B.P., Nuruieva, R., et.al., T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008;28:29-39.
13. Veldhoen, M., Hirota, K.; Westendorf, A.M., et al., The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008;453:106-9.
14. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2008;9:1297-306.
15. Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zhen, M., et al., IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275-81.
16. Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., et al., Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-9.
17. Yu, D., Batten, M., Mackey, C.R., et al., Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells. *Curr Opin Immunol* 2009;21:619-25.

18. Shevach, E.M., Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636-45.
19. Jonuleit, H. and E. Schmitt, The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003;171:6323-7.
20. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
21. Carding, S.R. and P.J. Egan, Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:336-45.
22. Bonneville, M., R.L. O'Brien, and W.K. Born, Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:467-78.
23. Hayday, A., et al., Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001;2:997-1003.
24. Born, W.K., et al., Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. *J Immunol* 2010;184:4055-61.
25. Vantourout, P. and A. Hayday, Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013;13:88-100.
26. Haas, J.D., González, F.H., Schmitz, S., et al., CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells. *Eur J Immunol* 2009;39:3488-97.
27. Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., et al., CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 2009;10:427-36.
28. Jensen, K.D., et al., Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* 2008; 29:90-100.
29. Hayday, A. and R. Tigelaar, Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:233-42.
30. Salmi, M. and S. Jalkanen, Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev* 2005;206:100-13.
31. Springer, T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-72.
32. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky, Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med* 2001;193:1149-58.
33. Zlotnik, A. and O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
34. Moser, B. and P. Loetscher, Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:123-8.
35. Ransohoff, R.M., L. Liu, and A.E. Cardona, Chemokines and chemokine receptors: multipurpose players in neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 2007;82:187-204.

36. Levesque, J.P., et al., Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003;111:187-96.
37. Cyster, J.G., Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-102.
38. Mebius, R.E., Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 2003;3:292-303.
39. Hammond, M.E., et al., IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 1995;155:1428-33.
40. Matsukawa, A., et al., Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol* 1999;163:6148-54.
41. Muller, G., U.E. Hopken, and M. Lipp, The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev* 2003;195:117-35.
42. Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet, How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901-10.
43. Springer, T.A., Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34.
44. Arbones, M.L., et al., Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1994;1:247-60.
45. Rosen, S.D., Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004;22:129-56.
46. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006;119:3901-3.
47. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007;25:619-47.
48. Shimizu, Y., LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nat Immunol* 2003;4:1052-4.
49. Cybulsky, M.I., et al., A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-62.
50. Cannistra, S.A., et al., Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by peritoneal mesothelium partly mediates the binding of activated human T lymphocytes. *Exp Hematol* 1994;22:996-1002.
51. Li, F.K., et al., Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. *Kidney Int* 1998;54:2170-83.
52. Mebius, R.E., Lymphoid organs for peritoneal cavity immune response: milky spots. *Immunity* 2009;30:670-2.
53. Ansel, K.M., R.B. Harris, and J.G. Cyster, CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 2002;16:67-76.
54. Fagarasan, S., N. Watanabe, and T. Honjo, Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev* 2000;176:205-15.
55. Berberich, S., et al., Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. *J Immunol* 2008;180:2196-203.

56. Berberich, S., R. Forster, and O. Pabst, The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. *Blood* 2007;109:4627-34.
57. Stoermann, B., et al., B-1a cells are imprinted by the microenvironment in spleen and peritoneum. *Eur J Immunol* 2007;37:1613-20.
58. Mowat, A.M., Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-41.
59. Ishikawa, H., et al., Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev* 2007;215:154-65.
60. Finch, P.W. and A.L. Cheng, Analysis of the cellular basis of keratinocyte growth factor overexpression in inflammatory bowel disease. *Gut* 1999;45:848-55.
61. Yang, H., et al., Intestinal intraepithelial lymphocyte gamma delta-T cell-derived keratinocyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. *J Immunol* 2004;172:4151-8.
62. Konkel, J.E., et al., Control of the development of CD8alphaalpha+ intestinal intraepithelial lymphocytes by TGF-beta. *Nat Immunol*, 2011;12:312-9.
63. Macpherson, A.J., M.M. Martinic, and N. Harris, The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:2088-96.
64. Ivanov, II and D.R. Littman, Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:106-14.
65. Cash, H.L., et al., Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313:1126-30.
66. Rouvier, E., et al., CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 1993;150:5445-56.
67. Ness-Schwickerath, K.J. and C.T. Morita, Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2371-90.
68. Brand, S., Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1152-67.
69. Dong, C., Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 2006;6:329-33.
70. Veldhoen, M., et al., TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-89.
71. Harrington, L.E., et al., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
72. Bettelli, E., et al., Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
73. Sutton, C.E., et al., Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009;31:331-41.

74. Cua, D.J. and C.M. Tato, Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:479-89.
75. Eberl, G. and D.R. Littman, Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. *Science* 2004;305:248-51.
76. Naito, T., et al., ROR gamma t is dispensable for the development of intestinal mucosal T cells. *Mucosal Immunol* 2008;1:198-207.
77. Lugerling, A. and T. Kucharzik, Induction of intestinal lymphoid tissue: the role of cryptopatches. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:210-7.
78. Sun, Z., et al., Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 2000;288:2369-73.
79. Laan, M., et al., Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999;162:2347-52.
80. Roilides, E., et al., Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 1991;163:579-83.
81. Shibata, K., et al., Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* 2007;178:4466-72.
82. Blaschitz, C.; and M. Raffatellu, Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J Clin Immunol* 2010;30:196-203.
83. Shen, Y.M., et al., Inhibition of Pim-1 kinase ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2009;57:1822-31.
84. Pott, J. and M. Hornef, Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep* 2012;13:684-98.
85. Seldenrijk, C.A., et al., Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 1991;32:1514-20.
86. Hugot, J.P., et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
87. Ogura, Y., et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
88. Saleh, M. and C.O. Elson, Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity* 2011;34:293-302.
89. Hoffmann, J.C., et al., Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology* 2002;70:121-30.
90. Elson, C.O., et al., Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005;206:260-76.
91. Varona, R., et al., CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2003;33:2937-46.
92. Liu, J., et al., Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-15.

93. Baumgart, D.C., et al., Tacrolimus is safe and effective in patients with severe steroid-refractory or steroid-dependent inflammatory bowel disease--a long-term follow-up. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1048-56.
94. Dubinsky, M.C. and P.P. Fleshner, Treatment of Crohn's Disease of Inflammatory, Stenotic, and Fistulizing Phenotypes. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003;6:183-200.
95. Hanauer, S.B., Immunogenicity of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:2155-6.
96. Rutgeerts, P., et al., Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
97. Cook, D.N., et al., CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 2000;12:495-503.
98. Cyster, J.G. and C.C. Goodnow, Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *J Exp Med* 1995;182:581-6.
99. Mallick-Wood, C.A., et al., Conservation of T cell receptor conformation in epidermal gammadelta cells with disrupted primary Vgamma gene usage. *Science* 1998;279:1729-33.
100. Sharp, L.L., et al., Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol* 2005;6:73-9.
101. Vroom, T.M., et al., Tissue distribution of human gamma delta T cells: no evidence for general epithelial tropism. *J Clin Pathol* 1991;44:1012-7.
102. Wang, C., et al., The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2009;2:173-83.
103. Johansson-Lindbom, B. and W.W. Agace, Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev* 2007;215:226-42.
104. Pabst, O., et al., Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J Exp Med* 2004;199:411-6.
105. Uehara, S., et al., Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *J Immunol* 2002;168:134-42.
106. Wurbel, M.A., et al., CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS One* 2011;6:16442.
107. Kunkel, E.J., et al., CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* 2003;111:1001-10.
108. Lazarus, N.H., et al., A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol* 2003;170:3799-805.
109. Jin, Y., et al., CCR10 is important for the development of skin-specific gammadeltaT cells by regulating their migration and location. *J Immunol* 2010;185:5723-31.
110. Baaten, B.J., et al., CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* 2010;31:104-15.
111. DeGrendele, H.C., et al., CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1997;159:2549-53.

112. Crabtree, G.R., Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 1989;243:355-61.
113. Lasky, L.A., et al., An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-38.
114. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30:646-55.
115. Waite, J.C. and D. Skokos, Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam* 2012;2012:819467.
116. Martin, B., et al., Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009;31:321-30.
117. Asigbetse, K.E., P.A. Eigenmann, and C.P. Frossard, Intestinal lamina propria TcRgammadelta+ lymphocytes selectively express IL-10 and IL-17. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:391-401.
118. Park, S.G., et al., T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells. *Immunity* 2010;33:791-803.
119. Nanno, M., et al., gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev* 2007;215:103-13.
120. Haas, J.D., et al., Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity* 2012;37:48-59.
121. Narayan, K., et al., Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct gammadelta T cell subtypes. *Nat Immunol* 2012;13:511-8.
122. Dong, C., Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. *Microbes Infect* 2009;11:584-8.
123. Korn, T., et al., IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-7.
124. Yu, C.R., et al., SOCS1 regulates CCR7 expression and migration of CD4+ T cells into peripheral tissues. *J Immunol* 2008;181:1190-8.
125. Takahashi, R., et al., SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *J Exp Med* 2011;208:2055-67.
126. Tamiya, T., et al., Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:980-5.
127. Kano, S., et al., The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2008;9:34-41.
128. Hutloff, A., et al., ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397:263-6.
129. Yoshinaga, S.K., et al., T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999;402:827-32.
130. Wei, L., et al., IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 2007;282:34605-10.

131. Bauquet, A.T., et al., The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 2009;10:167-75.
132. Sato, K., et al., Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. *J Biol Chem* 2011;286:14963-71.
133. Peng, S., et al., c-Maf interacts with c-Myb to down-regulate Bcl-2 expression and increase apoptosis in peripheral CD4 cells. *Eur J Immunol* 2007;37:2868-80.
134. Cannarile, M.A., et al., Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* 2006;7:1317-25.
135. Wang, L., et al., The zinc finger transcription factor Zbtb7b represses CD8-lineage gene expression in peripheral CD4+ T cells. *Immunity*, 2008;29:876-87.
136. Xu, D., et al., Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998;188:1485-92.
137. Nakae, S., et al., Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 2007;81:1258-68.
138. Infante-Duarte, C., et al., Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107-15.
139. Lahn, M., et al., Early preferential stimulation of gamma delta T cells by TNF-alpha. *J Immunol* 1998;160:5221-30.
140. Hopken, U.E., et al., CCR7 regulates lymphocyte egress and recirculation through body cavities. *J Leukoc Biol* 2012;87:671-82.
141. Kunkel, E.J., et al., Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 2000;192:761-8.
142. Fujiie, S., et al., Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB [correction of NK-kappaB]. *Int Immunol* 2001;13:1255-63.
143. Carramolino, L., et al., Down-regulation of the beta-chemokine receptor CCR6 in dendritic cells mediated by TNF-alpha and IL-4. *J Leukoc Biol* 1999;66:837-44.
144. Sallusto, F., et al., Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998;28:2760-9.
145. Hu, S. and N. Xiong, Programmed downregulation of CCR6 is important for establishment of epidermal gammadeltaT cells by regulating their thymic egress and epidermal location. *J Immunol* 2013;190:3267-75.
146. Pan, J., et al., A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol* 2000;165:2943-9.
147. Hu, S., et al., Critical roles of chemokine receptor CCR10 in regulating memory IgA responses in intestines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:1035-44.
148. Hieshima, K., et al., CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol* 2003;170:1452-61.

149. Catalina, M.D., P. Estess, and M.H. Siegelman, Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* 1999;93:580-9.
150. Berg, E.L., et al., The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1991;174:1461-6.
151. Fuhlbrigge, R.C., et al., Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997;389:978-81.
152. Berlin, C., et al., alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413-22.
153. Connor, E.M., et al., Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol* 1999;65:349-55.
154. Bargatze, R.F., M.A. Jutila, and E.C. Butcher, Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995;3:99-108.
155. Nandi, A., P. Estess, and M. Siegelman, Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity* 2004;20:455-65.
156. Stout, R.D., et al., Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005;175:342-9.
157. Gonzaga, R., P. Matzinger, and A. Perez-Diez, Resident peritoneal NK cells. *J Immunol* 2011;187:6235-42.
158. Häcker, H. and K.-H. Stapf, Dorsch Psychologisches Wörterbuch. 15 ed. 2009, Bern:Huber.1266.
159. Fieren, M.W., The local inflammatory responses to infection of the peritoneal cavity in humans: their regulation by cytokines, macrophages, and other leukocytes. *Mediators Inflamm* 2012;2012:976241.
160. Margry, B., et al., Peritoneal cavity B-1a cells promote peripheral CD4 T-cell activation. *Eur J Immunol* 2013;43:2317-2326
161. Parra, D., et al., Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2012;91:525-36.
162. Gordon, S., Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35.
163. Palos, M.C., et al., Different inflammatory stimuli in the footpad of mice influence the kinetics of resident peritoneal cells. *Inflamm Res* 2012;61:1187-94.
164. Mora, J.R., et al., Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med* 2005;201:303-16.
165. Campbell, D.J. and E.C. Butcher, Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med* 2002;195:135-41.
166. Stock, A., G. Napolitani, and V. Cerundolo, Intestinal DC in migrational imprinting of immune cells. *Immunol Cell Biol* 2013;91:240-9.

167. Iwata, M., et al., Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004;21:527-38.
168. Edele, F., et al., Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J Immunol* 2008;181:3745-9.
169. Mora, J.R., et al., Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 2006;314:1157-60.
170. Elgueta, R., et al., Imprinting of CCR9 on CD4 T cells requires IL-4 signaling on mesenteric lymph node dendritic cells. *J Immunol* 2008;180:6501-7.
171. Schild, H., et al., The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 1994;76:29-37.
172. Malhotra, N., et al., A network of high-mobility group box transcription factors programs innate interleukin-17 production. *Immunity* 2013;38:681-93.
173. Hayes, S.M. and R.M. Laird, Genetic requirements for the development and differentiation of interleukin-17-producing gammadelta T cells. *Crit Rev Immunol* 2013;32:81-95.
174. Godfrey, D.I., et al., A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 1993;150:4244-52.
175. Shibata, K., Close link between development and function of gamma-delta T cells. *Microbiol Immunol* 2012;56:217-27.
176. Ciofani, M., et al., Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* 2006;25:105-16.
177. Heilig, J.S. and S. Tonegawa, Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 1986;322:836-40.
178. Pereira, P., et al., Ontogenic development and tissue distribution of V gamma 1-expressing gamma/delta T lymphocytes in normal mice. *J Exp Med* 1995;182:1921-30.
179. Malinarich, F.H., et al., Constant TCR triggering suggests that the TCR expressed on intestinal intraepithelial gammadelta T cells is functional in vivo. *Eur J Immunol* 2010;40:3378-88.
180. Reboldi, A., et al., C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009;10:514-23.
181. Chien, Y.H., X. Zeng, and I. Prinz, The natural and the inducible: interleukin (IL)-17-producing gammadelta T cells. *Trends Immunol* 2012;34:151-4.
182. Alex, P., et al., Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:341-52.
183. Zheng, Y., et al., Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14:282-9.
184. Cai, X.Y., et al., Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol Lett* 1998;62:51-8.

185. Hsu, H.C., et al., Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008;9:166-75.
186. Jovanovic, D.V., et al., IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998;160:3513-21.
187. Brown, J.B., et al., P-selectin glycoprotein ligand-1 is needed for sequential recruitment of T-helper 1 (Th1) and local generation of Th17 T cells in dextran sodium sulfate (DSS) colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:323-32.
188. Edelblum, K.L., et al., Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7097-102.
189. Swamy, M., et al., Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nat Immunol* 2010;11:656-65.
190. Chennupati, V., et al., Intra- and intercompartmental movement of gammadelta T cells: intestinal intraepithelial and peripheral gammadelta T cells represent exclusive nonoverlapping populations with distinct migration characteristics. *J Immunol* 2010;185:5160-8.
191. Prinz, I., Dynamics of the interaction of gammadelta T cells with their neighbors in vivo. *Cell Mol Life Sci* 2010;68:2391-8.
192. Inagaki-Ohara, K., et al., Mucosal T cells bearing TCRgammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J Immunol* 2004;173:1390-8.
193. Chen, Y., et al., Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14338-43.
194. Hoffmann, J.C., et al., Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. *Gut* 2001;48:489-95.
195. Byrne, F.R., et al., rHuKGF ameliorates symptoms in DSS and CD4(+)CD45RB(Hi) T cell transfer mouse models of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:690-701.
196. Jameson, J.M., et al., Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med* 2005;201:1269-79.
197. O'Brien, R.L., C.L. Roark, and W.K. Born, IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 2009;39:662-6.
198. O'Connor, W., Jr., et al., A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:603-9.
199. Roark, C.L., et al., gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 2008;20:353-7.
200. Do, J.S., et al., 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* 2010;184:1675-9.
201. Straube, F. and T. Herrmann, Expression of functional CD8alpha Beta heterodimer on rat gamma delta T cells does not correlate with the CDR3 length of the TCR delta chain predicted for MHC class I-restricted antigen recognition. *Eur J Immunol* 2000;30:3562-8.

202. Jeong, S.P., J.A. Kang, and S.G. Park, Intestinal intraepithelial TCRgammadelta(+) T cells are activated by normal commensal bacteria. *J Microbiol* 2012; 50:837-41.
203. Ismail, A.S., C.L. Behrendt, and L.V. Hooper, Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* 2009;182:3047-54.
204. Ismail, A.S., et al., Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:8743-8.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Schematische Darstellung der CD4-T-Zelldifferenzierung	3
Abb. 2:	Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen	6
Abb. 3:	Vier-Stufen-Modell der Leukozytenmigration	7
Abb. 4:	Mechanismen der mukosalen Immunantwort am Beispiel des Dünndarms	14
Abb. 5:	Repräsentative <i>Gating</i> -Strategie peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in der <i>Dotplot</i> Darstellung	37
Abb. 6:	Der Anteil CCR6 ⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen ist im Peritoneum höher als in der Milz	38
Abb. 7:	Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren kein CCR9	40
Abb. 8:	Chemotaktisches Verhalten peritonealer Lymphozyten	41
Abb. 9:	Adhäsionsmoleküle und Integrine auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen in der <i>Dotplot</i> -Darstellung	43
Abb. 10:	Vergleich der Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen und Integrinen splenozytärer und peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen	44
Abb. 11:	Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp	45
Abb. 12:	Quantifizierung der IL-17 Produktion von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum von Wt, ROR γ t ^{-/-} , CCR6 ^{-/-} Mäusen sowie bei Wt-Tieren mit DSS-induzierter Kolitis	47
Abb. 13:	Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t in peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen von Wt und ROR γ t ^{-/-} Mäusen in der <i>Dotplot</i> -Darstellung	49
Abb. 14:	Peritoneale IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t	50
Abb. 15:	Repräsentative <i>Gating</i> -Strategie der CD8 α -Expression IL-17-sekretierender $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon in der <i>Dotplot</i> -Darstellung	51
Abb. 16:	Untersuchung der CD8 α -Expression IL-17-sekretierender $\gamma\delta$ T-Zellen in Milz, Peritoneum und Kolon	52
Abb. 17:	In der Milz ist der Anteil CD27- und CD8 α -exprimierender $\gamma\delta$ T-Zellen höher als im Peritoneum	53
Abb. 18:	Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur RNA-Isolation aus splenozytären und peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen	54
Abb. 19:	Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen auf molekularer Ebene einen aktivierten T _H 17-Phänotyp	56

Abb. 20:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs und repräsentative <i>Gating</i> -Strategie splenozytärer $\gamma\delta$ T-Zellen nach intraperitonealem <i>Priming</i>	60
Abb. 21:	Splenozytäre $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen nach intraperitonealem <i>Priming</i> eine Hochregulation von CD44 und erlangen einen peritonealen Phänotyp	61
Abb. 22:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der intraperitonealen Transferexperimente	62
Abb. 23:	Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen migrieren in das entzündete Kolon	63
Abb. 24:	Peritoneale $\gamma\delta$ T-Zellen sind auch nach 36 Std. im entzündeten Kolon nachweisbar	64
Abb. 25:	Die Migration von peritonealen Lymphozyten in das entzündete Kolon stellt einen $G\alpha$ -gekoppelten Prozess dar	66
Abb. 26:	Schematische Darstellung der vergleichenden Migration intravenös und intraperitoneal injizierter Lymphozyten sowie repräsentative <i>Gating</i> -Strategie in der <i>Dotplot</i> -Darstellung	68
Abb. 27:	Intraperitoneal und intravenös und injizierte Splenozyten zeigen ein vergleichbares Migrationsverhalten in das entzündete Kolon	69
Abb. 28:	Modell der potentiellen Mechanismen des peritonealen <i>Imprintings</i>	77
Abb. 29:	Modell der Interaktion und Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in Peritoneum und Kolon	84

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1:	Klassifizierung, Expression und Distribution der Adhäsionsmoleküle und Integrine mit ihren korrespondierenden Liganden	10
Tab.2:	Modelle experimenteller Kolitis	17
Tab. 3:	Primärantikörper	22
Tab. 4:	Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellsubtypen	36
Tab. 5:	Tabellarische Übersicht der durchgeführten Transferexperimente	65

8. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. DANKSAGUNG

Mein herzlichster und ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Uta Höpken für ihre herausragende Betreuung sowie kontinuierliche Förderung meiner Arbeit während der beiden Forschungsfreiemester und darüber hinaus. Ihr außerordentliches Engagement und ihre wissenschaftliche Kompetenz haben wesentlich zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen.

Bei Herrn PD Dr. Martin Lipp bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe unter hervorragenden Arbeitsbedingungen zu absolvieren.

Mein Dank gilt auch dem Graduiertenkolleg IMMUCO des Sonderforschungsbereichs 633 „Induktion und Modulation T-zellvermittelter Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt“ für die Unterstützung meines Dissertationsprojekts.

Der Hans-Böckler-Stiftung sei an dieser Stelle herzlich für die jahrelange individuelle und finanzielle Förderung meines Studiums gedankt.

Ein ganz besonderer Dank gilt Katharina Wichner und Dr. Kristina Heinig für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragen sowie für die wunderschöne Zeit im Labor und außerhalb des MDC!

Kerstin Krüger danke ich für ihre hervorragende Unterstützung bei allen praktischen Tätigkeiten und für die zahlreichen praktischen Hinweise. Heike Schwede, Kerstin Gerlach, Jenny Grobe, Dr. Hans-Peter Rahn und Kirstin Rautenberg gilt ebenfalls mein herzlichster Dank für ihre ausdauernde praktische Hilfe.

Allen Mitgliedern der AG-Lipp und der AG-Rehm danke ich für die wundervolle Atmosphäre im Labor und die tolle Zeit am MDC!

Vielen Dank an Dr. Armin Rehm für seinen hervorragenden wissenschaftlichen Input bei den Work und Progress Seminaren. Bei allen PC und Software-relevanten Fragen war Dr. Gerd Müller für mich immer eine wertvolle Hilfe. Daniela Keyner sei für ihre Unterstützung in allen organisatorischen Belangen gedankt.

Mein tiefster Dank gilt zuletzt meinen Eltern Wolfgang und Verena Peter für ihren jahrelangen Rückhalt, ihre stets liebevolle Unterstützung und ihre Motivationsfähigkeit. Merci euch beiden für alles!!!

10. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

„Ich, Franziska Peter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Gewebspezifische Rekrutierung und Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Berlin, den 31.01.2014