

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind in Schüben verlaufende Entzündungen der Darmschleimhaut deren klinisch-histologisch definierte Hauptformen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind. Die Colitis ulcerosa (CU) ist eine kontinuierliche, konzentrische und proportionierte Entzündung, die auf die Mukosa des Kolons beschränkt ist. Sie befällt immer das Rektum und kann sich bis zum Zökum (Pancolitis) ausdehnen. Bei dem Morbus Crohn (MC) handelt es sich um eine diskontinuierliche, exzentrische und disproportionierte Entzündung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann. Obwohl sich die Verläufe (chronisch aktiv, steroidabhängig und steroidrefraktär) der CED durch die moderne medizinische Therapie deutlich verbessert haben, sind sie immer noch mit erhöhter Morbidität und hoher Rezidivrate vergesellschaftet. Die Lebensqualität vieler Patienten bleibt nach wie vor durch die Beschwerden, z.T. aber auch durch Nebenwirkungen und Folgen der medikamentösen und chirurgischen Therapie gemindert. Für die optimale Behandlung von CED-Patienten ist eine genaue Aufklärung der Etiologie und Pathogenese von CED unbedingt vonnöten. Die Etiologie und Pathogenese von CED sind noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass neben genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen, immunologische Faktoren eine zentrale Rolle spielen <sup>1</sup>.

Das intestinale Immunsystem stellt das größte Immunorgan des Körpers dar, das sich permanent mit einer Vielzahl von luminalen Antigenen auseinandersetzt. Unter physiologischen Bedingungen herrscht eine genaue Kontrolle über Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten und Makrophagen. So sind die Lamina propria Lymphozyten (LPL) beim Gesunden gegenüber der autologen Flora tolerant, während bei CED keine Toleranz vorliegt. Verantwortlich für die Entstehung und das Fortbestehen von CED sind unter anderem Überreaktionen des mukosalen Immunsystems auf persistierende intestinale Infektionen, Barrieredefekte der Mukosa und fehlregulierte Immunantworten auf ubiquitäre Antigene <sup>2</sup>. Vermittler dieser Überreaktionen sind unter anderem Zytokine, die von intraepithelialen Zellen, Lamina propria Makrophagen und T-Helferzellen sezerniert werden <sup>1</sup>. Die T-Helferzellen (Th) werden je nach ihrem Zytokinprofil grob in Th1- und Th2-Zellen eingeteilt. Th1-Zellen produzieren sogenannte Th1-Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und beeinflussen die zelluläre

Immunität. Th2-Zytokine fördern die humorale Abwehr, zu ihnen zählen u.a. Interleukin-4 und -10. Bei CED ist die normale Balance zwischen proinflammatorischen Th1- und antiinflammatorischen Th2-Zytokinen gestört<sup>2, 3</sup>. Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1, -6, -8, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  und Interferone (IFN) sind erhöht, während antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-4 und -10) erniedrigt sind. Bei MC sind hauptsächlich die Th1-Zytokine erhöht und die Th2-Zytokine erniedrigt. Bei CU ist z.B. nicht nur das Th1-Zytokin IL-2 erniedrigt, sondern die Konzentration der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 sind erhöht. Man spricht daher auch davon, dass es sich bei MC um eine Th1-vermittelte Erkrankung handelt, bei CU um eine Th2-vermittelte.

Um Überreaktionen des intestinalen Immunsystems zu verhindern, wird die T-Zellantwort physiologisch durch folgende Mechanismen reguliert: Apoptose, Homing-Beschränkung und Suppression. Für CED wurde ein Apoptose-Defekt nachgewiesen<sup>4, 5</sup>, wobei jedoch unklar ist, ob dieser Ursache oder Folge der Entzündung ist. Der therapeutische Erfolg von Infliximab (anti-TNF- $\alpha$ ) bei steroidrefraktärem MC scheint u.a. auf der Induktion von Apoptose bei T-Zellen und Makrophagen zu beruhen<sup>6</sup>. Die Rolle des Homing bei CED wird derzeit konträr diskutiert. Die homöostatische Lymphozyten-Rezirkulation umfasst die Einwanderung (Migration) und Retention (Homing) naiver peripherer Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe, während bei der inflammatorischen Migration periphere Leukozyten in entzündetes oder infiziertes Gewebe rekrutiert werden. Beide Prozesse werden über Adhäsionsmoleküle (u.a. Selektine und Integrine) und Chemokine gesteuert<sup>7</sup>. Im Tiermodell führte die Adhäsionsblockade (Homing-Beschränkung) zu einem milderen Colitis-Verlauf<sup>8</sup> und die Entwicklung einer Colitis konnte aufgrund Integrin-Defizienz verhindert werden<sup>9</sup>. Obwohl die Adhäsionsblockade in diesen Tierversuchen und auch bei der Behandlung aktiven MC im Rahmen einer klinischen Studie (Phase II) erfolgsversprechende Ergebnisse zeigte<sup>10</sup>, konnten diese Ergebnisse in der Phase III nicht bestätigt werden (unpubliziert). Eigene Versuche zur Adhäsionsblockade von neutrophilen Granulozyten zeigten einen fulminanten Colitisverlauf mit erhöhter Mortalität und extraintestinalen Manifestationen im Modell der TNBS-induzierten Colitis bei Ratten (unpubliziert). Letztendlich gewinnt die Suppression oder Prävention von Entzündungen durch körpereigene T-Zellen in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung. Diese „supprimierenden/präventiven“ T-Zellen werden als regulatorische T-Zellen

bezeichnet und besitzen einen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Phänotyp. Diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen sind anerg, d.h. sie zeigen geringe Proliferation gegenüber allogener und polyklonaler Stimulation<sup>11, 12</sup>. Diese Anergie kann durch hohe Dosen IL-2 aufgehoben werden<sup>13-15</sup>. Zusätzlich supprimieren sie die Aktivierung und Proliferation konventioneller T-Zellen via Zell-Zell-Kontakt<sup>12, 15</sup>. Aber auch Zytokine wie IL-10 und der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- $\beta$  spielen bei den regulatorischen Effektorfunktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Rolle<sup>12, 16, 17</sup>, ebenso wie der Transkriptionsfaktor Foxp3<sup>18</sup> und das zytotoxische T-Zell-assoziierte Antigen CTLA-4<sup>13</sup>. Aufgrund ihrer supprimierenden Eigenschaften sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage, intestinale Entzündungen zu kontrollieren und zu verhindern<sup>19-21</sup>. Da diese regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen auch *ex vivo* generiert werden können<sup>13, 15, 22</sup>, könnten sie therapeutisches Potenzial zur Behandlung von CED besitzen. Andererseits bestehen derzeit noch Zweifel bezüglich der Homogenität dieser *ex vivo* generierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation, da sie entweder durch repetitive Stimulation aus Vorläufer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) angereichert oder aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) selektioniert werden<sup>23, 24</sup>. So waren Mendel und Shevach<sup>25</sup> nicht in der Lage, eine einheitliche CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation zu generieren. Auch wurden vermehrt T-Zellen beschrieben, die sich ausserhalb dieser CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation befinden (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), aber ebenfalls regulatorisches Potenzial besitzen<sup>26-28</sup>. Eine andere T-Zellpopulation, für die die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  beschrieben wurde, sind  $\gamma\delta$  T-Zellen. Diese  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden Mitte der 80er-Jahre entdeckt<sup>29, 30</sup>. Da sie in geringerer Anzahl als  $\alpha\beta$  T-Zellen vorkommen, wurde ihnen anfangs keine bedeutende immunologische Rolle zugesprochen. In den letzten zwei Jahrzehnten ist das Interesse an ihnen jedoch deutlich gestiegen und mittlerweile sind ihre immunregulatorischen Fähigkeiten und ihr multifunktionelles Repertoire anerkannt.

## 1.2 $\gamma\delta$ T-Zellen

Erstmals beschrieben wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen im Jahre 1986. Damals wurden sie als eine kleine Population (3-5%) humaner PBL identifiziert, die weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Kette tragen und erhielten die Bezeichnung WT31<sup>-</sup>T3<sup>+</sup> $\beta$ F1-Zellen<sup>30</sup>. Diese Zellen sind hauptsächlich CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-doppelnegativ (DN)<sup>29, 30</sup>. Es zeigte sich, dass diese

DN  $\gamma\delta$  T-Zellen in der fötalen Entwicklung in allen Spezies noch vor den  $\alpha\beta$  T-Zellen auftreten (etwa 14 Tage nach Befruchtung) <sup>31, 32</sup>. Dominieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen allerdings noch in der frühen Ontogenese, so tragen nach der Geburt nicht mehr als 10% der peripheren T-Zellen den  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor ( $\gamma\delta$ TCR). Daher rührte das Wissen über T-Zellen jahrelang hauptsächlich von den gewonnen Erkenntnissen über  $\alpha\beta$  T-Zellen, während nur wenig über  $\gamma\delta$  T-Zellen bekannt war. In den letzten 20 Jahren ist das Interesse an und somit das Wissen über  $\gamma\delta$  T-Zellen stark gestiegen. Allerdings scheinen sich  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen weniger in ihren Effektorfunktionen zu unterscheiden als vielmehr in ihrer Kinetik und Lokalisation <sup>33</sup>. Und obwohl wenige variable Gensegmente (z.B. 6  $V\gamma$ - und  $V\delta$ -Gene beim Menschen) für den  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor vorhanden sind, ist das Rezeptorrepertoire der  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenso divers wie das der  $\alpha\beta$  T-Zellen <sup>34, 35</sup>.

Die Entwicklung der  $\gamma\delta$  T-Zellen findet im fötalen und adulten Thymus sowie thymusunabhängig statt <sup>36</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zellpopulationen, die sich im fötalen Thymus entwickeln, homen später hauptsächlich im Epithel; d.h. in der Haut und in der Mukosa von Uterus, Vagina und Zunge <sup>33, 36</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zellpopulationen, die sich im adulten Thymus entwickeln, siedeln überwiegend im peripheren Blut und in Lymphorganen, manchmal auch in mukosalem Gewebe <sup>33</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen, die thymusunabhängig entstehen, entwickeln sich im intestinalen Epithel, wo sie auch homen <sup>33, 36</sup>. Man spricht auch von einer präferierten Expression einiger  $V\gamma/V\delta$ -Gene an bestimmten anatomischen Orten <sup>35</sup>; beispielsweise tragen 70% der humanen  $\gamma\delta$  PBL den  $V\gamma9V\delta2$ - und nur 30% den  $V\gamma9V\delta1$ -Rezeptor, während  $V\gamma9V\delta1$  T-Zellen die Hauptpopulation im Epithel stellen <sup>33</sup>. Beim Menschen sind zwar weniger als 5% der peripheren und lymphatischen Lymphozyten  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>, jedoch 5-15% der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) des Dünndarms und etwa 40% der IEL des Dickdarms <sup>37</sup>. In der Maus sind  $\gamma\delta$  T-Zellen häufiger vertreten: sie stellen 35-65% der IEL des Dünndarms und 100% der vaginalen und epidermalen IEL <sup>38</sup>.

Ebenso divers wie das Rezeptorrepertoire und die Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen sind auch ihre funktionellen Eigenschaften. So expandieren  $\gamma\delta$  T-Zellen sehr schnell, noch vor  $\alpha\beta$  T-Zellen, infolge Infektionen mit Mycobakterien, Protozoen, Sporozoen, Parasiten, Viren und Bakterien <sup>32, 34, 36</sup>. Allein die Verteilung der  $\gamma\delta$  T-Zellen weist schon auf ihre protektive Rolle bei Infektionen hin, da sie gering in Blut und

Lymphgewebe vertreten sind, jedoch vermehrt im Epithelgewebe von Haut und intestinaler Mukosa, d.h. den Orten für infektiöse Erstkontakte, vorkommen<sup>39</sup>. Allerdings sind nicht alle  $\gamma\delta$  T-Zellantworten bei Infektionen protektiv, einige verstärken auch die Pathologie; Zeitpunkt, Ausmaß und Zusammensetzung der  $\gamma\delta$  T-Zellantwort hängen von der Pathogenlast, der Virulenz und der Infektionsroute ab<sup>39</sup>. Beispielsweise konnte bereits 1995 gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen in der frühen Entzündungsphase zwischen Pathogenen differenzieren. Im Tiermodell unterschieden  $\gamma\delta$  T-Zellen zwischen *Listeria monocytogenes* und *Nippostrongylus brasiliensis* und produzierten dementsprechend Th1- bzw. Th2-Zytokine<sup>40</sup>.

Dass die  $\gamma\delta$  T-Zellantwort noch vor der  $\alpha\beta$  T-Zellantwort erfolgt, liegt an der Fähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen, Antigene direkt, MHC-unabhängig, zu erkennen<sup>41, 42</sup>, während  $\alpha\beta$  T-Zellen erst die Prozessierung und Präsentation des Antigens benötigen. Ferner erkennen  $\gamma\delta$  T-Zellen ein breites Spektrum an Antigenen. Neben peptidischen Antigenen erkennen sie sogenannte Phospho-Antigene<sup>34, 43, 44</sup>, Alkylamine<sup>34, 45, 46</sup> und Aminobiphosphonate<sup>43, 47</sup>, aber auch Eigen-Antigene<sup>32, 48</sup> wie Stress-induzierte heat shock proteins (hsp)<sup>33, 49</sup>. So werden infizierte oder maligne transformierte Zellen von  $\gamma\delta$  T-Zellen über nicht-klassische MHC-Moleküle wie CD1c, MICA/B und hsp erkannt<sup>50, 51</sup> resultierend in einer verstärkten Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen und der MHC-unabhängigen Tumorzelllyse<sup>52, 53</sup>. Aufgrund der MHC-unabhängigen Erkennung und Zytolyse der Tumorzellen scheinen  $\gamma\delta$  T-Zellen für die Tumorabwehr besser geeignet als  $\alpha\beta$  T-Zellen, da während der Tumorprogression häufig MHC-Allele und tumorspezifische Antigene herunterreguliert werden<sup>54</sup>. Ihre Zytotoxizität vermitteln  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Sekretion von Perforin und Granzymen sowie über Fas/FasL<sup>32, 35, 55</sup>.

Allerdings wirken  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht nur destruktiv (Zytolyse), sondern überwiegend protektiv:  $\gamma\delta$  T-Zellen sind eher an der Immunüberwachung auf Zellschäden beteiligt als an der Überwachung von Fremd-Antigen<sup>32, 56</sup>. Im murinen System stehen epidermale  $\gamma\delta$  T-Zellen in engem Kontakt mit Keratinozyten und erkennen MHC-unabhängig Eigen-Antigen geschädigter Keratinozyten, woraufhin sie an der Regeneration des geschädigten Epithels beteiligt sind<sup>57, 58</sup>. Diese dendritischen epidermalen T-Zellen (DETC) sind bei der Maus zu 100%  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup><sup>58, 59</sup>. Nicht nur in der Haut überwachen  $\gamma\delta$  T-Zellen die epitheliale Integrität, sondern auch in der

Lunge<sup>60</sup> und im Darm<sup>61-63</sup>. An der epithelialen Regeneration sind sie durch die Produktion von Wachstumsfaktoren (FGF, KGF und CTGF) und Hyaluronsäure, wichtige Komponenten der Wundheilung, beteiligt<sup>35, 58, 59, 63-66</sup>.

Ferner sezernieren sie nicht nur Th1-Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ <sup>33, 34, 55, 67-69</sup>, sondern auch antiinflammatorische Th2-Zytokine<sup>33, 67, 70</sup> und protektives TGF- $\beta$ <sup>71, 72</sup> zur Regulation überschießender Immunantworten. D.h. sie wirken immunregulatorisch, indem sie die Immun-Homöostase aufrechterhalten und Immunantworten von  $\alpha\beta$  T-Zellen<sup>69, 73, 74</sup> und Makrophagen<sup>67, 70, 75, 76</sup> herunterregulieren bzw. hyperreaktive Zellen abtöten. Bei anderen Überreaktionen wie z.B. Allergien wird ihr regulatorisches Potenzial allerdings kontrovers diskutiert<sup>77, 78</sup>. Kontrovers wird auch ihre Rolle bei CED diskutiert.

### 1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen bei CED

Theoretisch bietet sich ein therapeutischer Einsatz von  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Behandlung von CED an, da sie immunregulatorisches Potenzial besitzen, an der epithelialen Regeneration beteiligt sind und sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine sezernieren. So könnten  $\gamma\delta$  T-Zellen bei CED Überreaktionen des mukosalen Immunsystems supprimieren, geschädigtes Gewebe regenerieren und die epitheliale Integrität wiederherstellen sowie die Zytokindisbalance ausgleichen. In der Praxis zeigen  $\gamma\delta$  T-Zellen jedoch kein einheitlich protektives Bild hinsichtlich ihrer Rolle bei CED. So konnte durch den Transfer von  $\gamma\delta$  T-Zellen in Mäuse, die humanes CD3 $\epsilon$  überexprimieren (tg $\epsilon$ 26), eine Colitis induziert werden<sup>79</sup>. Allerdings wurden diese transferierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus  $\alpha\beta$ TCR ko Mäusen isoliert. Man kann also davon ausgehen, dass es sich bei den transferierten  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht um „konventionelle“  $\gamma\delta$  T-Zellen handelte, da  $\gamma\delta$  T-Zellfunktionen in  $\alpha\beta$ TCR ko Mäusen verändert sind<sup>80</sup>. Ferner konnte die Verbesserung einer spontanen CED in  $\alpha\beta$ TCR ko Mäusen infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion beobachtet werden<sup>81</sup>. Dies mag jedoch ebenfalls den veränderten  $\gamma\delta$ T-Zellfunktionen in  $\alpha\beta$  TCR ko Mäusen geschuldet sein. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, konnte eine andere Arbeitsgruppe durch den Transfer von  $\gamma\delta$  T-Zellen keine Colitis in den Rezipienten induzieren, wohl aber durch den Transfer von  $\alpha\beta$  T-Zellen<sup>82</sup>. Ebenso konnte die Mortalitätsrate in  $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis durch den Transfer von  $\gamma\delta$  IEL gesenkt werden<sup>72</sup>.

Verantwortlich für das gesteigerte Überleben scheint die Produktion von TGF- $\beta$  dieser transferierten  $\gamma\delta$  IEL zu sein <sup>72</sup>. Ein Jahr später zeigte sich, dass IEL die einzigen intestinalen T-Zellen sind, die junctionale Proteine exprimieren und dass  $\gamma\delta$  IEL Occludin und E-Cadherin exprimieren <sup>83</sup>. D.h.  $\gamma\delta$  IEL sind an der Epithelzellbindung beteiligt und erhalten die Integrität der epithelialen Barriere. Aufgrund Barrierestörungen sind  $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse vermutlich empfänglicher für chemisch-induzierte Colitis <sup>83</sup>. Diese gesteigerte Empfänglichkeit der  $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse für chemisch-induzierte Colitis konnte von Chen et al. bestätigt werden, die gleichzeitig zeigten, dass  $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse mit DSS-induzierter Colitis eine verminderte Epithelzellproliferation aufweisen <sup>62</sup>. Für die Beteiligung der  $\gamma\delta$  T-Zellen an der epithelialen Regeneration spricht ferner, dass intestinale  $\gamma\delta$  IEL physikalisch mit Epithelzellen assoziiert sind und den Keratinozyten-Wachstumsfaktor 1 produzieren <sup>57, 61, 62</sup>. Auch Tsuchiya et al. <sup>84</sup> bestätigten die gesteigerte Empfänglichkeit der  $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse für DSS-induzierte Colitis, schlussfolgerten jedoch, dass eine erhöhte Infiltration mit Makrophagen ursächlich sei. Dies deckt sich mit Ergebnissen bei Ratten, bei denen infolge DSS-induzierter Colitis ein Anstieg an  $\gamma\delta$  T-Zellen und Makrophagen im Kolon zu beobachten ist <sup>85</sup>. Ferner führte in Ratten mit TNBS-induzierter Colitis die Depletion von  $\gamma\delta$  T-Zellen, jedoch nicht von  $\alpha\beta$  T-Zellen, zu einem fulminanten Colitisverlauf <sup>86</sup>. Letztendlich zeigte sich in Samp/Yit Mäusen, die eine chronische Ileitis entwickeln, eine Abnahme an Cryptopatches und damit an  $\gamma\delta$  IEL; diese Abnahme korreliert mit der Entwicklung der intestinalen Entzündung <sup>63</sup>. Ein weiterer inflammatorischer Faktor in  $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen sind unkontrollierte  $\alpha\beta$  T-Zellantworten. Im Infektionsmodell zeigten  $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse infolge *Eimeria vermiformis*-Infektion eine schwerwiegende intestinale Schädigung, da sie nicht in der Lage waren, die Folgen der  $\alpha\beta$  T-Zellantwort zu regulieren <sup>74</sup>.

Intestinale T-Zellen gliedern sich in drei Subpopulationen: Peyer'sche Plaque Lymphozyten (PPL), Lamina propria Lymphozyten (LPL) und intraepitheliale Lymphozyten (IEL). Obwohl LPL und IEL eng beieinanderstehen, sind sie funktionell und phänotypisch verschieden. LPL ähneln phänotypisch peripheren T-Zellen und homen nach Rezirkulation in der intestinalen Mukosa, während IEL gar nicht rezirkulieren <sup>87</sup>. In dieser IEL-Population finden sich CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen, die sich

aus dem CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Pool entwickelt haben<sup>38, 88</sup>. Sie besitzen sowohl zytolytisches als auch regulatorisches Potenzial und befinden sich in einem intermediären Aktivierungszustand („activated yet resting“)<sup>88</sup>. Bei CU-Patienten zeigte sich ein Anstieg an  $\gamma\delta$  PBL vom gleichen Phänotyp wie intestinale  $\gamma\delta$  IEL, V $\gamma$ 8V $\delta$ 1, wodurch man auf ein Auftreten intestinaler  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Peripherie schließen kann<sup>89</sup>. Ferner fanden sich im Kolon dieser Patienten basal-lymphatische Aggregate, die eine Vielzahl apoptoseresistenter  $\gamma\delta$  T-Zellen enthielten. Diese mukosalen  $\gamma\delta$  T-Zellen migrieren als immunregulatorische Antwort auf gestresste Lymphozyten oder als Ersatz für defekte Helferzellen in diese Aggregate<sup>89</sup>. Auch bei MC-Patienten kommt es zu einem Anstieg mukosaler  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>90</sup>. D.h. CED-Patienten zeigen eine Veränderung mukosaler  $\gamma\delta$  T-Zellen in Zahl, Verteilung, Zusammensetzung und Funktion<sup>91</sup>.

Zusammenfassend kann man sagen, dass vieles für eine protektive Rolle der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei CED spricht. Die Rolle der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei intestinalen Entzündungen muss jedoch detaillierter untersucht und aufgeklärt werden, um langfristige Ziele bei der Behandlung von CED ableiten zu können. Hierbei sind Untersuchungen im Tiermodell unerlässlich.

#### **1.4 CED-Tiermodelle**

Das erste Colitis-Modell wurde 1961 beschrieben<sup>92</sup>. Seitdem hat die Entwicklung neuer experimenteller CED-Tiermodelle viel zum heutigen Verständnis über die mukosale Immunität und Pathophysiologie des Darmes beigetragen. Tiermodelle können zwar die Komplexität der Erkrankung im menschlichen Körper nur unvollständig wiedergeben und Studien mit Patienten nicht ersetzen, sie dienen jedoch der reproduzierbaren Untersuchung vieler wichtiger Krankheitsaspekte *in vivo*. Tiermodelle geben im Gegensatz zu klinischen Untersuchungen an Patienten Einsichten über die zeitlichen Verläufe und pathophysiologischen Veränderungen vor Krankheitsausbruch. Zusätzlich erlauben sie Aussagen über Umweltfaktoren und Nahrungsantigene durch spezielle Haltungsmethoden (konventionelle, pathogenfreie und keimfreie Haltung) und variable Futtermittelzusammensetzungen. Der Einsatz gentechnisch veränderter Tiere ermöglicht zusätzlich die Untersuchung genetischer Faktoren *in vivo*.

Von der Core Facility „CED-*in-vivo*-Modelle“ des Kompetenznetzes „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (KN CED) werden CED-Tiermodelle formal in fünf Kategorien eingeteilt: Antigen-spezifische und bakterielle, induzierbare, genetische, adaptive Transfer- und spontane Modelle<sup>93</sup>. Obwohl eine Vielzahl an CED-Tiermodellen existiert und ihre Zahl stetig steigt, wurde ein allumfassendes Modell, das die humane Erkrankung exakt widerspiegelt, noch nicht beschrieben. Vielmehr müssen zur Untersuchung bestimmter Aspekte bestimmte Modelle herangezogen werden, z.B. lassen sich epitheliale Barrieredefekte gut in induzierbaren und genetischen Modellen untersuchen, während Umweltfaktoren gut in Antigen-spezifischen Modellen abgebildet sind. Da  $\gamma\delta$  T-Zellen ein multifunktionelles Repertoire besitzen, wurden verschiedene CED-Tiermodelle verwendet, um die Effektorfunktionen *in vivo* zu untersuchen. Die Rolle regulatorischer  $\gamma\delta$  T-Zellen bei CED wurde in induzierbaren und genetischen Mausmodellen erforscht.

#### **1.4.1 Induzierbare Mausmodelle**

Induzierbare CED-Modelle gliedern sich in chemisch-, immunologisch- und physikalisch-induzierte Modelle<sup>93</sup>. Von den induzierbaren Modellen werden die chemisch-induzierten am häufigsten verwendet. Die chemisch-induzierte Colitis beruht auf einer vorübergehenden (akuten) oder chronischen Entzündung des Kolons, die durch chemische Zerstörung der mukosalen Barriere hervorgerufen wird. Das Agens wird häufig oral oder intrarektal, selten subkutan oder intramural appliziert. Von den chemisch-induzierbaren Modellen sind die DSS-induzierte Colitis und die TNBS-induzierte Colitis die gebräuchlichsten. Beide Modelle sind schnell und einfach durchführbar, preiswert und gut reproduzierbar. Sie erlauben die dynamische Studie des Entzündungsprozesses von der Entstehung bis zur Remission und sind somit für Untersuchungen der epithelialen Regeneration und Wundheilung sowie zum Arzneimittelscreening gut geeignet<sup>94, 95</sup>. Daher wurden diese beiden Modelle zur Untersuchung der Rolle von  $\gamma\delta$  T-Zellen bei CED verwendet.

#### 1.4.1.1 DSS-induzierte Colitis

Durch die orale Gabe (Verabreichung über das Tränkewasser) von Dextransulfat (DSS) kann eine akute (kontinuierliche Gabe) oder chronische (zyklische Gabe) Colitis in Mäusen, Hamstern und Ratten induziert werden<sup>96</sup>. Die Verlaufsform und Empfänglichkeit sind abhängig von dem Tierstamm, der Konzentration und der Molekülgröße des DSS<sup>97</sup>. Die Induktion der Colitis erfolgt durch toxische Effekte des DSS auf das mukosale Epithel (vermehrt apoptotische Epithelzellen)<sup>98</sup> sowie durch die Phagozytose von DSS durch Makrophagen<sup>96</sup>. Die daraus resultierende Aktivierung des mukosalen Immunsystems erfolgt sowohl durch den epithelialen Barriereverlust als auch durch die Präsentation des phagozytierten und prozessierten DSS. Aufgrund des epithelialen Barriereverlustes kommt es zum Kontakt zwischen luminalen Antigenen und den LPL, welche zusätzlich durch das präsentierte DSS zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-2 und IL-6) stimuliert werden<sup>99</sup>. Das Zytokinprofil der DSS-induzierten Colitis ist jedoch nicht Th1-betont, sondern ist durch eine Th1/Th2-Coexistenz (IL-4 und IFN- $\gamma$ ) gekennzeichnet<sup>99</sup>. Die akute DSS-induzierte Colitis ist neben der epithelialen Schädigung durch multiple Erosionen und Ulzerationen sowie Kryptenabszesse gekennzeichnet, die sich hauptsächlich linksseitig auswirken<sup>96, 99</sup>. Die chronische DSS-induzierte Colitis wird durch mindestens drei wöchentliche DSS-Zyklen induziert, zwischen denen jeweils eine Pause von 5-7 Tagen liegt, in der die Tiere reines Tränkewasser erhalten. Sie zeichnet sich durch Ulzerationen und Läsionen mit infiltrierenden Makrophagen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Plasmazellen aus<sup>94</sup>. Die Tiere weisen Gewichtsverlust, Diarrhoe, rektale Blutungen und ein verkürztes Kolon auf<sup>94, 96, 99</sup>. Nach Absetzen des DSS kommt es zu einer langsamen epithelialen Regeneration<sup>99</sup>. Neben dem Zytokinprofil ähnelt die DSS-induzierte Colitis auch histopathologisch der CU beim Menschen<sup>95</sup>. Nach Vorbehandlung mit dem Prokarzinogen Azoxyethan resultiert die chronische DSS-induzierte Colitis in kolorektale Karzinome<sup>100, 101</sup>, wodurch dieses Modell ebenfalls zur Klärung der Zusammenhänge zwischen langfristiger Colitis und kolorektaler Karzinogenese geeignet ist.

#### 1.4.1.2 TNBS-induzierte Colitis

Durch intrarektale Applikation des Haptens 2,4,6-Trinitrobenzoesäure (TNBS) in ethanolischer Lösung (30-50%) kann in Mäusen, Ratten und Kaninchen eine Colitis induziert werden <sup>102-104</sup>. Auch hier sind die Verlaufsform und die Empfänglichkeit abhängig von dem Tierstamm und der Konzentration des TNBS sowie des Ethanol <sup>105</sup>. Das Ethanol permeabilisiert die Kolonmukosa, wodurch das TNBS in die Darmwand eindringen kann. Dort bindet das TNBS an das Gewebe und wird von Immunzellen als Antigen erkannt <sup>102</sup>. Ähnlich der DSS-induzierten Colitis handelt es sich bei der TNBS-induzierten Colitis nicht um eine rein chemische Colitis. Aufgrund der chemischen Zerstörung der mukosalen Barriere sind die frühen Veränderungen des mukosalen Epithels zwar architektonischer Natur, werden jedoch gefolgt von Immunreaktionen auf das TNBS. Die TNBS-induzierte Colitis weist drei Formen auf: akut, chronisch und letal, wobei die Verlaufsform ebenfalls vom Tierstamm abhängig ist <sup>105</sup>. Für die Induktion einer chronischen Colitis können mehrere Injektionen erforderlich sein <sup>105</sup>. Der Mausstamm C57BL/6 soll gegenüber TNBS-induzierter Colitis resistent sein <sup>105</sup>; nach Vorsensitivierung (epikutane Applikation) kann jedoch auch in diesem Mausstamm eine Colitis induziert werden <sup>106</sup>. Die intrarektale TNBS-Applikation resultiert in akuter, transmuraler Nekrose, die vermutlich auf oxidativer Schädigung beruht <sup>94</sup>. Die epitheliale Nekrose und gesteigerte mukosale Permeabilität resultieren in hoch geschädigtem Epithel. Während der akuten Phase kommt es zu einer massiven Infiltration der Lamina propria mit Neutrophilen und Makrophagen gefolgt von einem erhöhten Einstrom an CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der chronischen Phase <sup>94, 105</sup>. Die Tiere zeigen starken Gewichtsverlust, schwere Diarrhoe, rektale Blutungen und Kolonwandverdickungen. Nach der Colitisinduktion heilt das Epithel kontinuierlich ohne Rezidiv. In den letzten Jahren wurde es schwieriger, hochkonzentriertes TNBS kommerziell zu erwerben. Das Hapten 2,4-Dinitrobenzoesäure (DNBS) erwies sich als zweckmäßiger Ersatz. Die DNBS-induzierte Colitis ist hinsichtlich des makroskopischen und histologischen Erscheinungsbildes sowie des Grades der Granulozyteninfiltration mit der TNBS-induzierten Colitis vergleichbar <sup>102</sup>. Histopathologisch ähnelt die TNBS/DNBS-induzierte Colitis dem Morbus Crohn beim Menschen (diskontinuierlich, transmural) <sup>94, 105, 107</sup>. Auch das Zytokinprofil (erhöhte Spiegel an IL-12 und IFN- $\gamma$  sowie Beteiligung von TNF- $\alpha$ ) ist mit dem humanen MC vergleichbar <sup>105, 108, 109</sup>, obwohl unter bestimmten experimentellen Bedingungen IL-4 exprimierende Th2-

Zellen überwiegen können<sup>104</sup>. Vermutlich handelt es sich im Verlauf der TNBS/DNBS-induzierten Colitis um eine Coexistenz der Th1- und Th2-Antwort, bei der je nach Entzündungsstadium eine Antwort dominiert<sup>108</sup>.

### **1.4.2 Genetische Mausmodelle**

Genetische CED-Modelle gliedern sich in transgene (tg) und knockout (ko) Modelle, die durch Einschleusen bestimmter Gene in das Erbgut (tg) oder die Deletion gewisser Gene aus dem Erbgut (ko) eines Tieres generiert werden. Die Zucht dieser genetisch veränderten Tiere führt zu einer Mutantenlinie mit klar definierten genetischen Anomalien. Die ersten genetischen Modelle wurden im Jahre 1993 beschrieben. Bei ihnen handelte es sich um ko-Modelle mit spontaner Colitisentwicklung. Die Tiere besaßen entweder eine Zytokindefizienz (IL-2 ko, IL-10 ko)<sup>110, 111</sup> oder T-Zelldefizienz ( $\alpha$ TCR ko,  $\beta$ TCR ko,  $\alpha\beta$ TCR ko, MHC-II ko)<sup>112</sup>. Seitdem ist die Zahl der genetischen Modelle rapide gestiegen<sup>93</sup>. Bis auf das Modell der HLA-B27/ $\beta_2$ m transgenen Ratte, deren gastrointestinale Entzündung mit Arthritis assoziiert ist, handelt es sich bei allen genetischen Modellen um Mausmodelle. Allerdings kommt es nicht in allen genetischen Modellen zu einer spontanen CED-Entwicklung, einige müssen einen zusätzlichen Stimulus erhalten. Die genetischen Modelle erlauben eine genaue Analyse der immunregulatorischen Signalwege und dienen der Identifikation spezifischer Therapeutika. Es können aber auch genetische Modelle mit anderen Modellen, z.B. induzierbaren, kombiniert werden bzw. Kreuzungen verschiedener Mutanten erlauben zusätzliche graduelle Untersuchungen.

#### **1.4.2.1 IL-2 ko Mäuse**

Interleukin 2 (IL-2) ist ein T-Zellwachstumsfaktor, der von aktivierten T-Zellen selbst gebildet wird und die Proliferation sowie Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen steuert. Mäuse mit homozygoter Defizienz für IL-2 (IL-2 ko) dienen als Modell für chronische, immunvermittelte Colitis<sup>111, 113, 114</sup>. Diese Tiere entwickeln sich in den ersten 3-4 Lebenswochen normal, im Alter von 4-9 Wochen bilden sie jedoch eine Autoimmunerkrankung (Anämie, Kachexie und Splenomegalie) aus, in deren Folge etwa 50% der Tiere versterben<sup>111</sup>. Die überlebenden Tiere entwickeln eine

CD4<sup>+</sup> T-Zellvermittelte Pancolitis, die histologisch der menschlichen Colitis ulcerosa ähnelt<sup>111</sup>. Diese Colitis entsteht hauptsächlich durch unkontrollierte Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>113, 115</sup> und nicht durch B-Zellen<sup>116</sup>, obwohl große Mengen beider Zelltypen das Kolon infiltrieren. Mit zunehmendem Alter der Tiere kommt es aufgrund unkontrollierter T-Zellproliferation und -aktivierung zu einer gestörten B-Zellentwicklung im Knochenmark. Daraus resultiert eine B-Zelldepletion und ein erniedrigter Immunglobulin-Serumspiegel<sup>117</sup>. Zusätzlich besitzen die T-Zellen in der Kolonmukosa (sowohl die LPL als auch die IEL) von IL-2 ko Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren zytotoxisches Potenzial<sup>115</sup>. Die Colitis in IL-2 ko Mäusen ist durch Infiltration der Mukosa mit Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen gekennzeichnet sowie einer erhöhten Anzahl mitotischer Epithelzellen; histologisch weist das Kolon Ulzerationen und Kryptenabzesse auf<sup>113</sup>. Diese Veränderungen zeigen sich besonders ausgeprägt in älteren Tieren (> 13 Wochen)<sup>113</sup>. Ein wesentlicher Faktor bei der Colitisentwicklung in IL-2 ko Mäusen ist die intestinale Mikroflora. Luminale mikrobielle Komponenten stellen einen persistierenden Stimulus dar, da die intestinale Entzündung unter konventionellen Haltungsbedingungen ernsthafter ausgeprägt ist als unter pathogenfreier Haltung (*Specific Pathogen Free*, SPF)<sup>111, 118, 119</sup>. Unter keimfreier Haltung (*Germfree*, GF) kommt es zu keiner Ausbildung einer Darmentzündung<sup>118, 120</sup> bzw. zu einer milden, fokalen und verzögerten Colitisentwicklung<sup>119</sup>, die wahrscheinlich durch totes Bakterienmaterial aus autoklaviertem Futter und Streu hervorgerufen wurde. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen fanden Meijssen et al. eine erhöhte CD14-Expression in kolonischen Epithelzellen und schlossen auf ein erhöhtes Ansprechen auf Lipopolysaccharide (LPS), ein Bestandteil der Bakterienmembran<sup>121</sup>. D.h. IL-2 ko Mäuse sind gegenüber LPS nicht tolerant und produzieren als Antwort auf bakterielle Stimuli proinflammatorische Zytokine. Da sich in IL-2 ko Mäusen die Colitis spontan entwickelt, scheint IL-2 eine wichtige Rolle bei der mukosalen Immunregulation zu spielen. Aber auch andere Th1-Zytokine wie IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  und das IL-8-Homolog KC spielen eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen der IL-2 ko Maus<sup>113, 121, 122</sup>, während das antiinflammatorische Zytokin IL-4 erniedrigt ist<sup>113</sup>. Zusätzlich fand sich eine erhöhte Expression von IL-12 und IL-15 in Epithelzellen, die vermutlich aufgrund ähnlicher biologischer Eigenschaften wie IL-2 die IL-2-Defizienz ausgleichen<sup>118, 119, 121</sup>.

#### 1.4.2.2 *TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse*

TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse besitzen im TNF-Gen eine 69 Basenpaare (bp) umfassende endogene Deletion der 3'-AU-Region, die zu einer erhöhten Konzentrationen an frei zirkulierendem TNF führt<sup>123</sup>. Diese TNF-Überproduktion resultiert in einer Polyarthrititis und in einer chronischen intestinalen Entzündung<sup>105, 123, 124</sup>. Heterozygote TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse entwickeln im Alter von 2-4 Wochen spontan eine intestinale Entzündung, die histologisch dem MC beim Menschen ähnelt. Die Entzündung bildet sich zuerst im terminalen Ileum aus (chronische transmurale Ileitis) und greift gelegentlich auf das proximale Kolon über<sup>123, 124</sup>. Frühe Läsionen bestehen aus mukosalen Veränderungen mit abgestumpften und verbreiterten Zotten. Mukosa und Submukosa weisen Infiltrationen akuter und chronischer Entzündungszellen auf. Mit fortschreitender Erkrankung breitet sich das Entzündungsinfiltrat in tiefere Wandschichten aus mit der MC-typischen transmuralen Entzündung. In alten Tieren (4-6 Monate) ist ein kompletter Zottenverlust zu beobachten<sup>123</sup>. Homozygote TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse sind aufgrund ihrer Multimorbidität als CED-Tiermodell weniger geeignet. Diese Tiere sind kleinwüchsig, ausgezehrt und haben ein struppiges Fell mit Alopecia-ähnlichen Läsionen. Die Pfoten sind verformt und weisen geschwollene Gelenke auf. Die Tiere versterben in der Regel in der 6. Lebenswoche.

Bei dem Modell der TNF<sup>ΔARE</sup> Maus handelt es sich um ein Modell, das 1999 entwickelt wurde und das eines der wenigen MC-Modelle darstellt<sup>124, 125</sup>. Obwohl beim Morbus Crohn der gesamten Gastrointestinaltrakt befallen sein kann, ist in 70% der Fälle das terminale Ileum betroffen<sup>126</sup>, wie im Modell der TNF<sup>ΔARE</sup> Maus.

TNF spielt bei der Pathophysiologie des MC eine wichtige Rolle, da es signifikant zur Veränderung der epithelialen Integrität und der Rekrutierung von Entzündungszellen beiträgt<sup>127</sup>, und weil sich im Umkehrschluss eine anti-TNF-gerichtete Therapie sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten mit aktivem, therapierefraktärem MC günstig auswirkt<sup>128, 129</sup>. Im Modell der TNF<sup>ΔARE</sup>-Maus spielt aber auch das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle, d.h. die direkte Regulierung der Leukozyten durch TNF scheint für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase im Darm wichtig zu sein<sup>123</sup>. Kreuzungsversuche von TNF<sup>ΔARE</sup> mit TNF-Rezeptor (TNFR)- und RAG1-ko Mäusen bestätigten zusätzlich eine Beteiligung der T- und B-Zellen sowie eine dominante Rolle für den TNFR I und eine untergeordnete Rolle für den TNFR II

in der Pathogenese der intestinalen Entzündung, da diese Doppelmutanten eine deutlich abgeschwächte Ileitis aufwiesen<sup>123</sup>.