

4 ERGEBNISSE

4.1 Einfluss einer $\gamma\delta$ T-Zelldepletion auf den Verlauf einer DSS-induzierten Colitis

Um den Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Entstehung und den Verlauf einer chemisch-induzierten Colitis zu untersuchen, wurden bei C57BL/6-Mäusen mit DSS-induzierter Colitis die $\gamma\delta$ T-Zellen durch i.p.-Applikation des anti- $\gamma\delta$ TCR mAk 13D5 depletiert (n = 9). Die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen begann mit Colitisinduktion an Tag 0. Kontrolltiere (n = 5) erhielten nach dem gleichen Behandlungsschema Hamster IgG (Ha IgG). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet und nachfolgend getötet.

Die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch an Splenozyten untersucht. Da die Depletion durch Applikation des anti- $\gamma\delta$ TCR mAk 13D5 erfolgte, wurde für die FACS-Messung der FITC-markierte anti- $\gamma\delta$ TCR mAk GL3 verwendet, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die FACS-Auswertung zeigte eine Reduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen um 97% infolge 13D5-Behandlung im Vergleich zu Ha IgG-behandelten Kontrolltieren (Abb. 1).

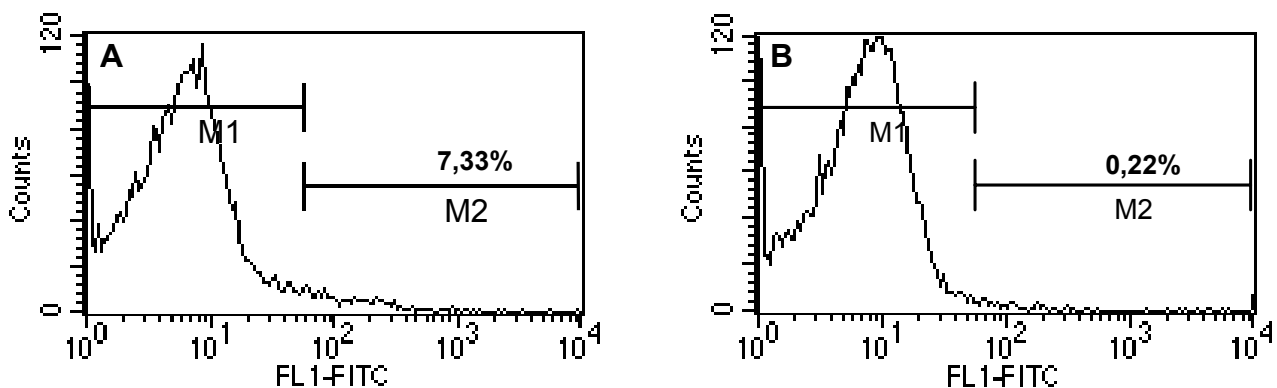


Abb. 1: Durchflusszytometrische Kontrolle der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Histogramm der FACS-Messung von Splenozyten aus (A) Ha IgG-behandelten und (B) 13D5-behandelten Mäusen mit GL3-FITC.

Sowohl $\gamma\delta$ T-Zell depletierte Mäuse als auch Kontrolltiere entwickelten sich in den ersten vier Tagen nach Colitisinduktion normal und unauffällig. Ab dem fünften Tag zeigten sich in beiden Versuchsgruppen klinische Symptome einer Colitis (Gewichtsverlust, Diarrhoe). In beiden Versuchsgruppen kam es zu einem kontinuierlichen und massiven Gewichtsverlust, der zur vorzeitigen Tötung der Tiere führte. Bezüglich der Mortalität zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: die durchschnittliche Überlebensdauer der $\gamma\delta$ T-Zell depletierten Tiere betrug 10 Tage, die der Kontrolltiere 9 Tage ($P = 0,352$). Die makroskopische Beurteilung der Kolons zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion auf äußere Anzeichen einer Entzündung. So wiesen $\gamma\delta$ T-Zell depletierte Mäuse einen mittleren makroskopischen Score (\pm STABW) von $3,3 \pm 0,5$ im Vergleich zu $3,4 \pm 0,5$ bei Kontrolltieren auf ($P = 0,692$). In beiden Tiergruppen wiesen die Kolons Ulzerationen und Entzündungen sowie Verkürzungen auf. Allerdings zeigte sich auch hier kein statistisch signifikanter Einfluss der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion auf die Kolonlänge. Die mittlere Kolonlänge (\pm STABW) bei $\gamma\delta$ T-Zell depletierten Mäusen betrug $4,8 \pm 0,3$ cm vs. $5,2 \pm 0,3$ cm bei Kontrolltieren, $P = 0,077$. Die histologische Beurteilung ergab jedoch eine schwerere Entzündung des Zökums und des Kolons $\gamma\delta$ T-Zell depletierter Mäuse. Diese Tiere wiesen in Zökum und Kolon ein dichtes, herdförmiges Entzündungsinfiltrat auf. Ferner zeigten sie einen Verlust der Epithelschicht, abheilende Ulzerationen und eine ödematöse Submukosa. Kontrolltiere wiesen ein geringeres, jedoch auch fokales, Entzündungsinfiltrat in Zökum und Kolon auf. Somit sind die histologischen Scores für Zökum und Kolon im Vergleich zu Kontrolltieren bei $\gamma\delta$ T-Zell depletierten Mäusen erhöht. Der mittlere histologische Score (\pm STABW) der Zökumsektionen $\gamma\delta$ T-Zell depletierter Mäuse betrug $3,9 \pm 0,4$ im Vergleich zu $3,0 \pm 0,0$ bei Kontrolltieren ($P < 0,05$) und der Kolonsektionen $4,0 \pm 0,0$ vs. $3,0 \pm 0,0$ bei Kontrolltieren ($P < 0,05$). Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand zeigte in LPL-Kulturen $\gamma\delta$ T-Zell depletierter Mäuse erhöhte Spiegel der Zytokine IFN- γ und IL-6 (Abb. 2) sowie einen Trend zu erhöhter Sekretion des Th2-Zytokins IL-10 (1.723 ± 639 pg/mL vs. 365 ± 146 pg/mL, $P = 0,1$). Allerdings zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Sekretion von IL-6 und IFN- γ bei mLKL und Splenozyten infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Die $\gamma\delta$ T-Zelldepletion hatte auch keinen statistisch signifikanten

Einfluss auf die Sekretion anderer Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α und TGF- β durch mLKL, Splenozyten und LPL.

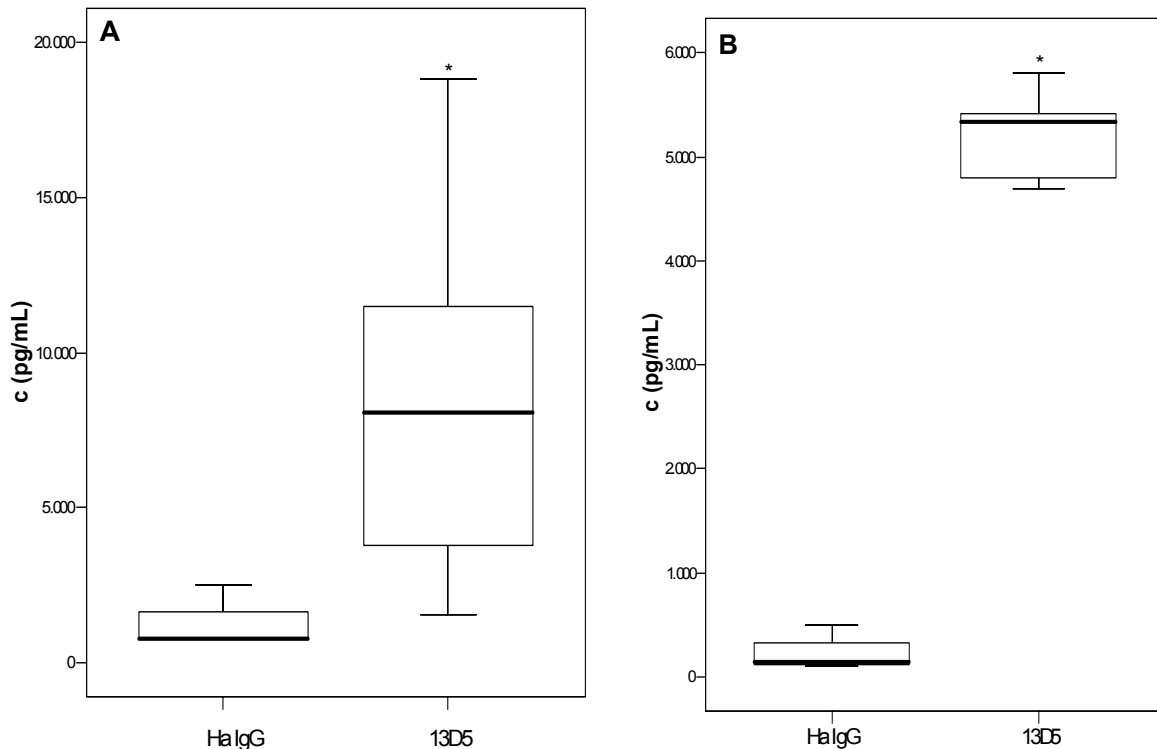


Abb. 2: Erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch LPL infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion bei DSS-induzierter Colitis. Konzentration c (pg/mL) an (A) IFN- γ und (B) IL-6 im LPL-Kulturüberstand von Kontrolltieren (Ha IgG-behandelt) und $\gamma\delta$ T-Zelldepletierten Mäusen (13D5-behandelt) bei DSS-induzierter Colitis; * $P > 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen.

Ferner wirkte sich die $\gamma\delta$ T-Zelldepletion nicht statistisch signifikant auf den Proliferationsindex von mLKL und Splenozyten aus (Tab. 1).

Tab. 1: Die $\gamma\delta$ T-Zelldepletion wirkte sich nicht auf die Proliferationsindizes aus. Mittlere Proliferationsindizes (PI \pm STABW) von stimulierten mLKL und Splenozyten von Mäusen mit DSS-induzierter Colitis infolge Behandlung mit Ha IgG (Kontrolle) und 13D5 ($\gamma\delta$ T-Zelldepletion).

| PI (-) | Kontrolle | $\gamma\delta$ T-Zelldepletion | P |
|-------------|--------------|--------------------------------|-------|
| mLKL | 121 \pm 78 | 79 \pm 47 | 0,505 |
| Splenozyten | 29 \pm 0,7 | 55 \pm 37 | 0,505 |

4.2 Verlauf einer DSS-induzierten Colitis bei $\gamma\delta$ T-Zelldefizienz

Um den Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Entstehung und den Verlauf einer chemisch-induzierten Colitis zu untersuchen und mögliche mAk-vermittelte Effekte auszuschließen, wurde eine DSS-induzierte Colitis bei C57BL/6-Mäusen mit $\gamma\delta$ T-Zelldefizienz ($\gamma\delta$ TCR ko, n = 7) und bei Kontrolltieren vom Wild-Genotyp (Wt, n = 7) untersucht. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet.

Während der ersten drei Tage nach Colitisinduktion erschienen die Tiere beider Versuchsgruppen normal und unauffällig. Es zeigte sich lediglich bei den Wt Mäusen ein leichter, kontinuierlicher Gewichtsverlust, während bei den $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen eine leichte Gewichtszunahme zu verzeichnen war. Klinische Symptome einer Colitis (Diarrhoe mit deutlichem Gewichtsverlust) zeigten sich in beiden Versuchsgruppen erst ab dem vierten Tag. Der Gewichtsverlust war in beiden Versuchsgruppen derart massiv, dass sämtliche Tiere vorzeitig getötet werden mussten. Hinsichtlich Gewichtsverlust und Mortalität zeigte sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Die defizienten Tiere hatten eine mittlere Überlebensdauer von 6,6 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die im Mittel 6,3 Tage überlebte ($P = 0,298$). Die makroskopische Beurteilung der Kolons von $\gamma\delta$ TCR ko und Wt Mäusen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des makroskopischen Scores. Der mittlere makroskopische Score (\pm STABW) $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse betrug $2,5 \pm 0,8$ im Vergleich zu $2,2 \pm 0,8$ bei Wt Mäusen ($P = 0,382$). Ebenso waren die Kolonlängen von $\gamma\delta$ TCR ko und Wt Mäusen ohne statistisch signifikanten Unterschied. Während $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse eine mittlere Kolonlänge (\pm STABW) von $4,1 \pm 0,7$ cm hatten, betrug die mittlere Kolonlänge bei Wt Mäusen $4,3 \pm 0,3$ cm ($P = 0,54$). Histologisch zeigte sich jedoch eine schwerere Entzündung in Zökum und Kolon von $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen. Während Zökum und Kolon von Wildtypen nur leichte Entzündungen und Erosionen aufwiesen, fielen Zökum und Kolon der $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse durch den teilweisen Verlust der Epithelschicht sowie durch massive Erosionen und vaskuläre Fibrinthromben auf (Abb. 3). Somit hatten $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse im Vergleich zu Wt einen erhöhten histologischen Score des Zökums und Kolons (Abb. 4).

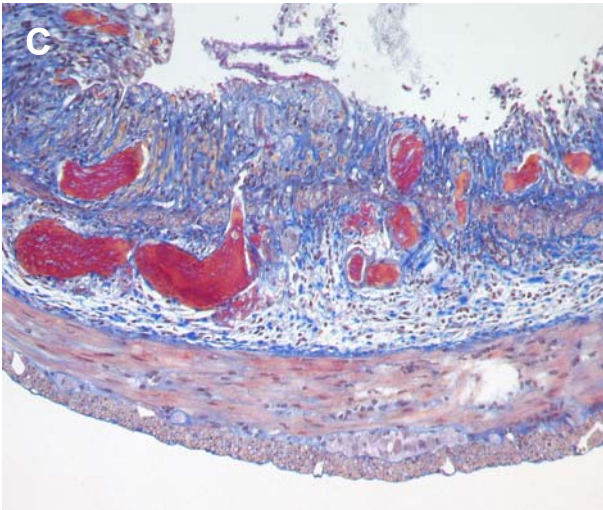
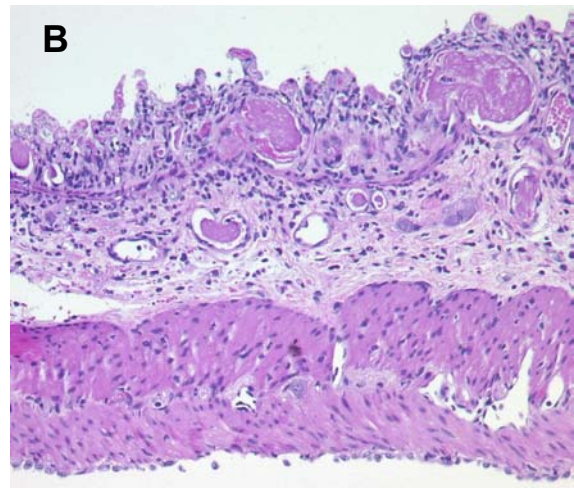
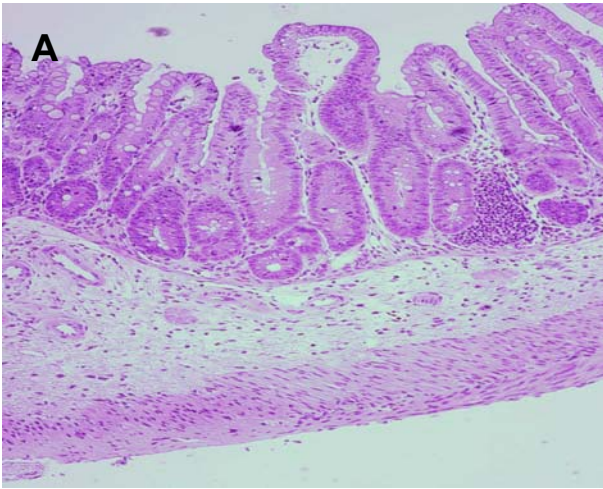


Abb. 3: Ausgeprägte Schädigung der Kolonmukosa bei $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen infolge DSS-induzierter Colitis. Repräsentative Kolonsektionen (200x) eines (A) Kontrolltiers (Wt) mit florider Entzündung, abheilender Ulzeration und Granulozytenfibrinschorf; Score = 2, einer (B) $\gamma\delta$ TCR ko Maus mit zerstörter Epithelschicht und vaskulären Fibrinthromben; Score = 4 und einer (C) $\gamma\delta$ TCR ko Maus nach Säurefuchsin-Färbung (vaskuläre Fibrinthromben erscheinen rot, das Bindegewebe ist blau eingefärbt).

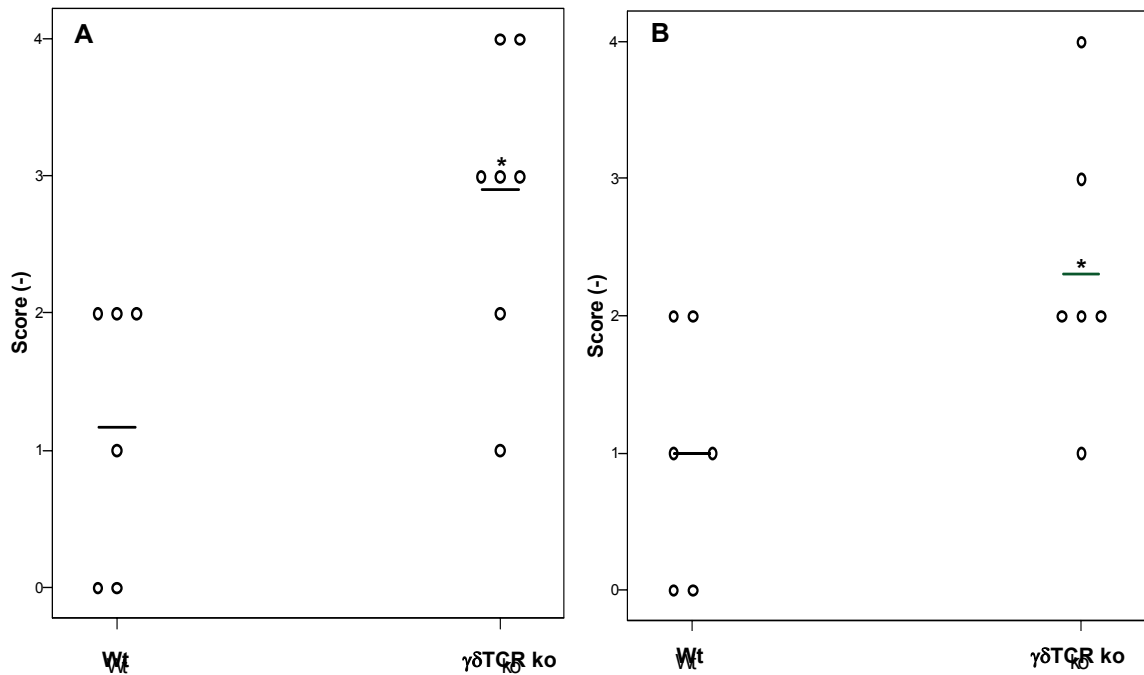


Abb. 4: Erhöhter histologischer Score von Zökum und Kolon aufgrund $\gamma\delta$ T-Zelldefizienz bei DSS-induzierter Colitis. Histologische Scores von (A) Zökum- und (B) Kolonsektionen von Wt und $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen bei DSS-induzierter Colitis (—: Mittelwerte); * $P < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen.

Ähnlich der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion bei DSS-induzierter Colitis, zeigten sich auch im Falle einer $\gamma\delta$ T-Zelldefizienz erhöhte Spiegel an IFN- γ im Kulturüberstand stimulierter LPL. Allerdings zeigten diese LPL zusätzlich eine erhöhte Sekretion der Th1-Zytokine IL-2 und TNF- α aber auch von IL-10 (Abb. 5). Während im LPL-Kulturüberstand von Wt Mäusen 646 ± 498 pg/mL TGF- β gemessen wurde, konnte im Überstand von $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen kein TGF- β detektiert werden ($P < 0,05$). Eine erhöhte IFN- γ -Sekretion bei gleichzeitig erniedrigter Sekretion von IL-10 zeigten mLKL (Abb. 6) und Splenozyten (Abb. 7) von $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen.

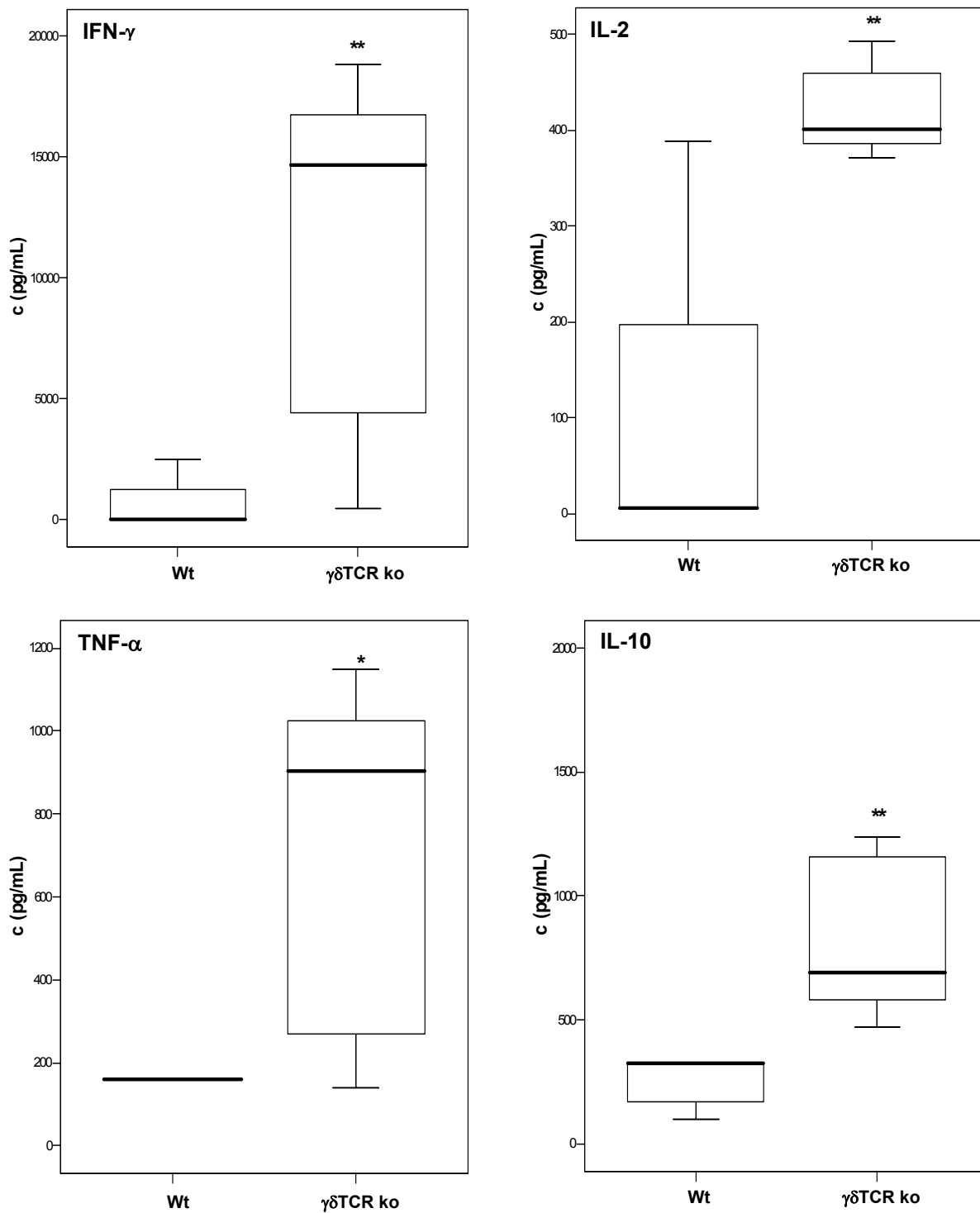


Abb. 5: Erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine aber auch des antiinflammatorischen IL-10 von LPL $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse. Konzentration c (pg/mL) an IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-10 im LPL-Kulturüberstand von Wt und $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis; * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

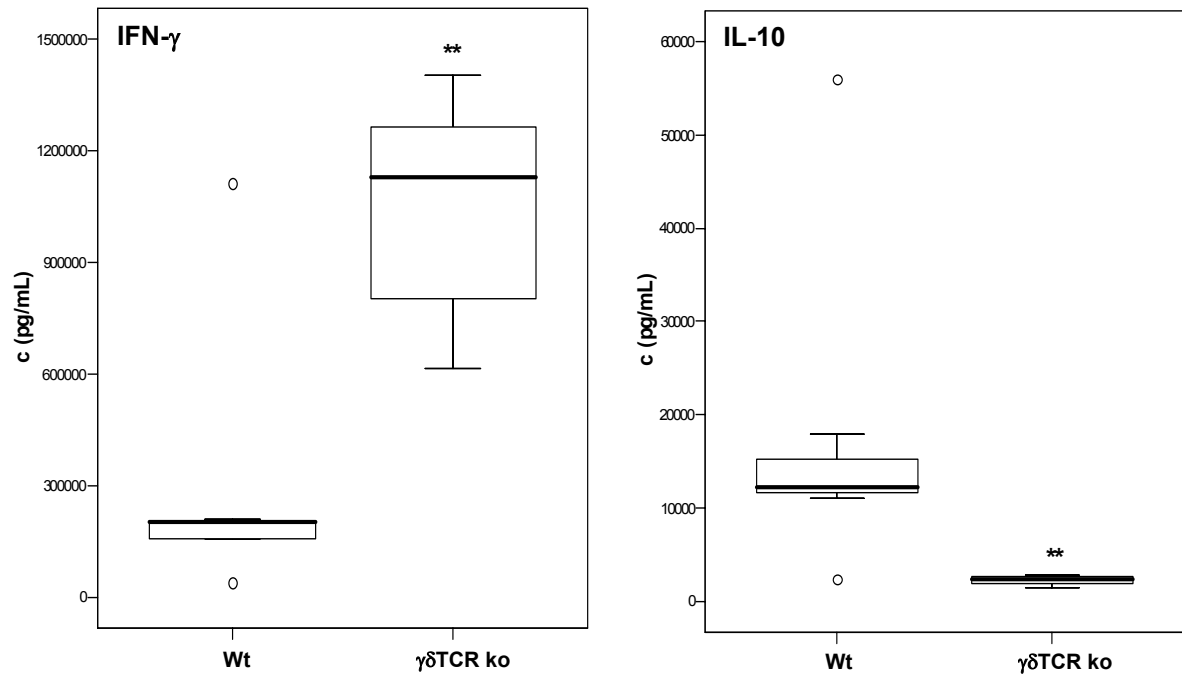


Abb. 6: Erhöhte IFN- γ -Sekretion und erniedrigte IL-10-Sekretion von mLKL von $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen. Konzentration c (pg/mL) an IFN- γ und IL-10 im Kulturüberstand stimulierter mLKL von Wt und $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis; ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

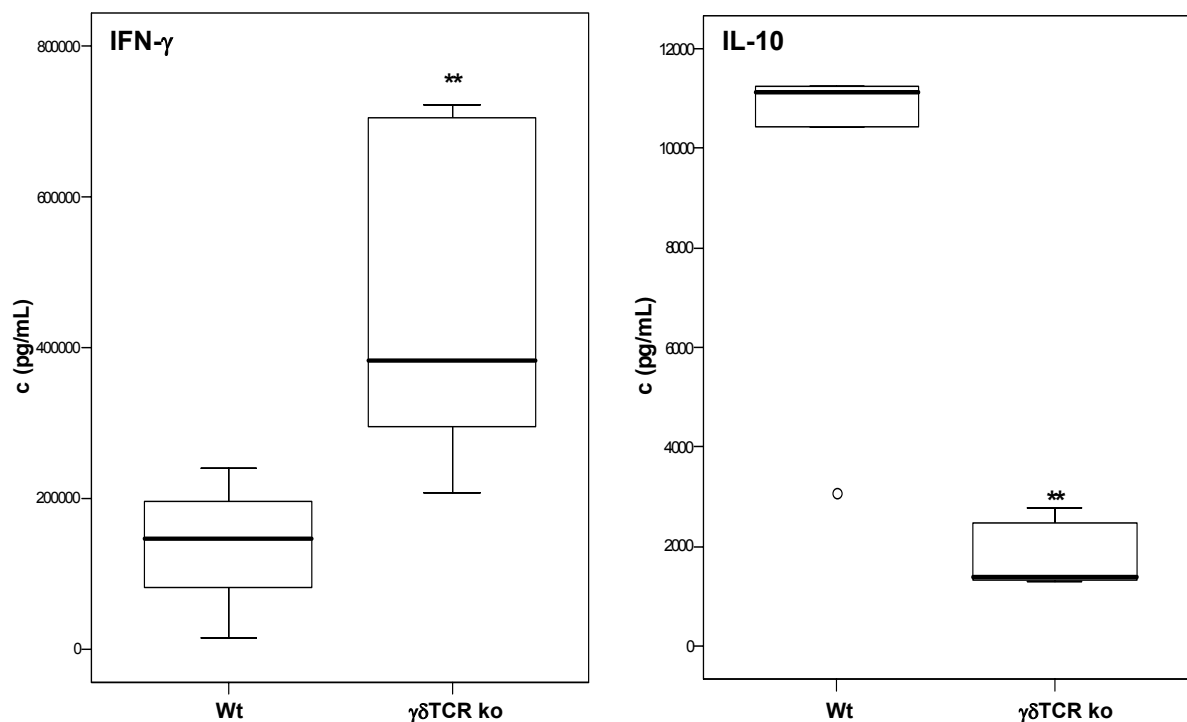


Abb. 7: Erhöhte IFN- γ -Sekretion und erniedrigte IL-10-Sekretion von Splenozyten von $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen. Konzentration c (pg/mL) an IFN- γ und IL-10 im Kulturüberstand stimulierter Splenozyten von Wt und $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis; ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

4.3 $\gamma\delta$ T-Zelldepletion im immunologischen Colitis-Modell der IL-2 ko Maus

Zur Untersuchung des Einflusses von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Entstehung und den Verlauf einer Colitis in einem immunologischen Tiermodell erfolgte die Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen bei IL-2 ko Mäusen vor Ausbildung einer Colitis (ab der vierten Lebenswoche, n = 18) und bei etablierter Colitis (ab der 8. Lebenswoche, n = 17) bis zur 12. Lebenswoche. Kontrolltiere wurden nach dem gleichen Behandlungsschema mit Ha IgG behandelt (n = 13 bei Früh- und n = 16 bei Spätdepletion). Die Tiere wurden bis zur 14. Lebenswoche beobachtet und nachfolgend getötet.

Die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch an Splenozyten unter Verwendung des FITC-markierten anti- $\gamma\delta$ TCR mAk GL3 untersucht. Die FACS-Auswertung ergab eine Reduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen um 85% (Abb. 8).

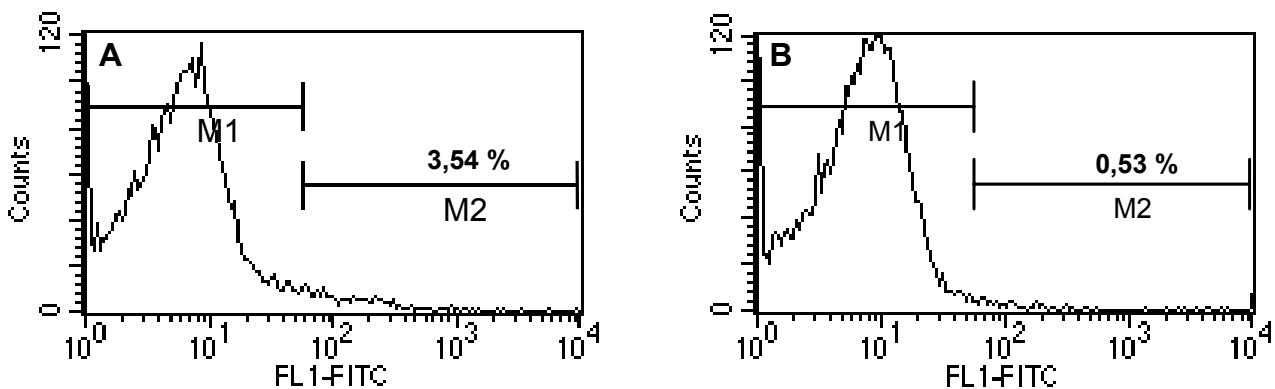


Abb. 8: Durchflusszytometrische Kontrolle der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Histogramm der FACS-Messung von Splenozyten aus (A) Ha IgG-behandelten und (B) 13D5-behandelten Mäusen mittels GL3-FITC.

Besonders auffallend war die erhöhte Mortalität der IL-2 ko Mäuse infolge Frühdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 9). Diese Tiere verstarben entweder spontan oder mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden, da sie auffällige Symptome zeigten (Schmerzkrümmung, Lethargie, Rektumprolaps) und damit die Tötungskriterien erfüllten. Einen statistisch signifikanten Einfluss auf den Gewichtsverlauf (Abb. 10) von IL-2 ko Mäusen zeigte die Frühdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen allerdings nicht. Die Spätdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte weder auf den Gewichtsverlauf (Abb. 10) noch auf die Überlebensrate der IL-2 ko Mäuse einen

statistisch signifikanten Einfluss. Die $\gamma\delta$ T-Zell depletierten Tiere überlebten im Mittel 4,1 Wochen, die Kontrolltiere 3,7 Wochen ($P = 0,803$).

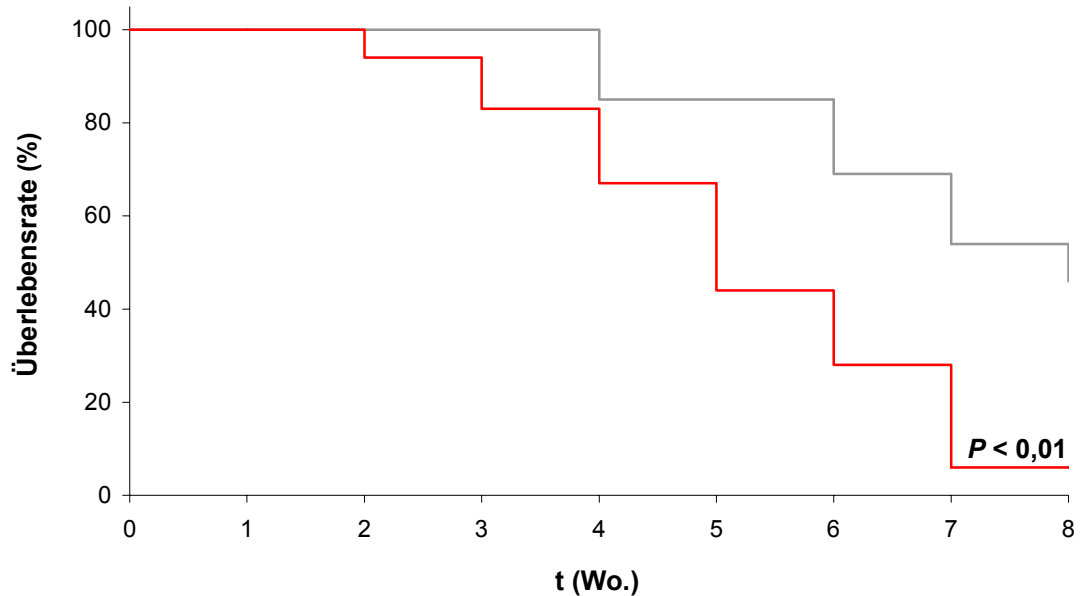


Abb. 9: Erhöhte Mortalität von IL-2 ko Mäusen infolge Frühdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen. Kaplan-Meier-Darstellung der Überlebensrate (%) ab Behandlungsbeginn ($t = 0$ Wochen) von IL-2 ko Mäusen bei Frühdepletion (ab der 4. Lebenswoche) der $\gamma\delta$ T-Zellen (—) im Vergleich zu Kontrolltieren (—).

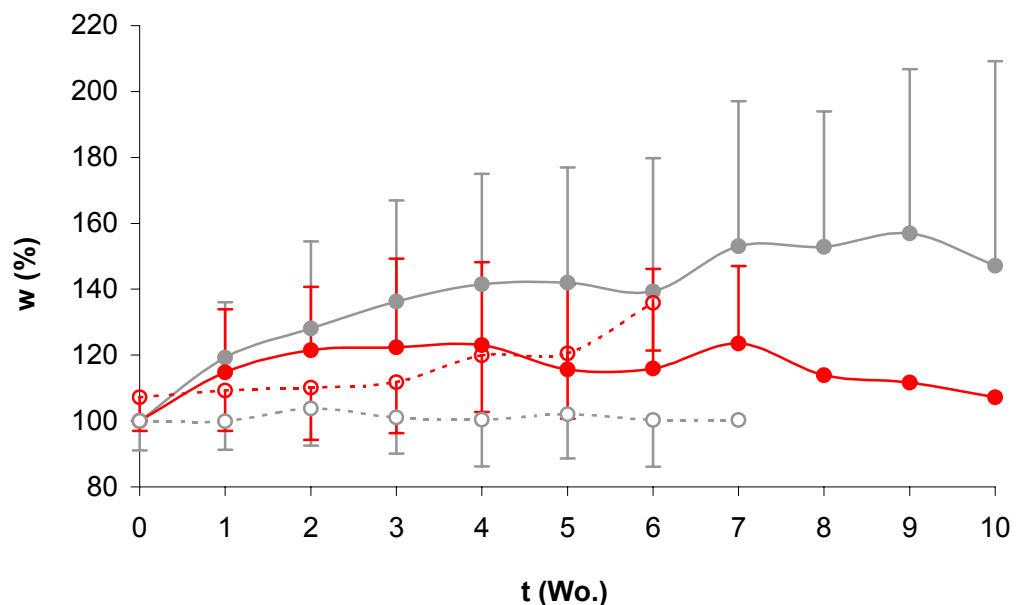


Abb. 10: Die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf von IL-2 ko Mäusen. Gewichtsverlauf (%) ab Behandlungsbeginn ($t = 0$ Wochen) von IL-2 ko Mäusen bei Früh- (—●—) und Spätdepletion (---o---) der $\gamma\delta$ T-Zellen (rot) im Vergleich zu Kontrolltieren (grau).

Ferner resultierte die Früh- jedoch nicht die Spätdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen in einer Verkürzung der Kolons. Infolge Frühdepletion betrug die mittlere Kolonlänge (\pm STABW) $\gamma\delta$ T-Zell depletierter IL-2 ko Mäuse $6,2 \pm 0,9$ cm im Vergleich zu $7,5 \pm 0,8$ cm bei Kontrolltieren ($P < 0,05$). Die makroskopische Beurteilung der Kolons zeigte eine mittlere Entzündungsschwere in beiden Versuchsgruppen und bei beiden Behandlungsansätzen. Der makroskopische Score war jedoch infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion, weder bei Früh- noch bei Spätdepletion, gegenüber Kontrolltieren signifikant verschieden (Tab. 2). Auch die histologische Beurteilung der Kolonsektionen wies auf eine mittlere Entzündungsschwere hin; auch hier zeigte sich weder infolge Früh- noch Spätdepletion ein statistisch signifikanter Unterschied der histologischen Scores gegenüber den Kontrolltieren (Tab. 2).

Tab. 2: Makroskopische und histologische Scores sind infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion nicht signifikant verschieden. Mittlere Scores (\pm STABW) von IL-2 ko Mäusen infolge Früh- und Spätdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen (Behandlung mit 13D5) im Vergleich zu Ha IgG-behandelten Kontrolltieren; Werte sind statistisch nicht signifikant (^{n.s.}).

| Score (-) | Behandlung ab 4. Woche | | Behandlung ab 8. Woche | |
|---------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Ha IgG | 13D5 | Ha IgG | 13D5 |
| makroskopisch | $1,9 \pm 0,8$ | $2,4 \pm 1,1^{\text{n.s.}}$ | $2,0 \pm 0,8$ | $2,3 \pm 1,2^{\text{n.s.}}$ |
| histologisch | $2,0 \pm 1,4$ | $2,2 \pm 1,4^{\text{n.s.}}$ | $1,6 \pm 1,3$ | $2,1 \pm 1,2^{\text{n.s.}}$ |

Die Ausbildung einer Splenomegalie ist ein typisches Merkmal der IL-2 ko Maus, die durch die Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen verschlimmert wurde. Die Milzen waren infolge Früh- und Spätdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen stark vergrößert (Abb. 11), was sich auch in einer Gewichtszunahme widerspiegelte (Abb. 12). Im Gegensatz hierzu steht die erniedrigte Proliferationsrate der Splenozyten infolge Frühdepletion. Der mittlere Proliferationsindex (\pm STABW) $\gamma\delta$ T-Zelldepletierter IL-2 ko Mäuse betrug $1,1 \pm 0,8$ im Vergleich zu $12,7 \pm 11,6$ bei den Kontrolltieren ($P < 0,05$).

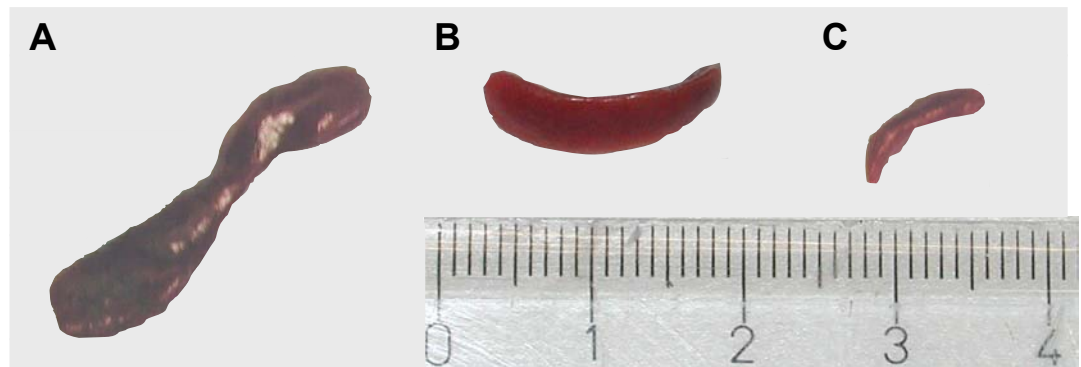


Abb. 11: **Ausgeprägte Splenomegalie bei IL-2 ko Mäusen infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion.** Repräsentative Bilder von Milzen von IL-2 ko Mäusen infolge Frühdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen (A) und Ha IgG-Behandlung (B) sowie von einer Wt Maus (C).

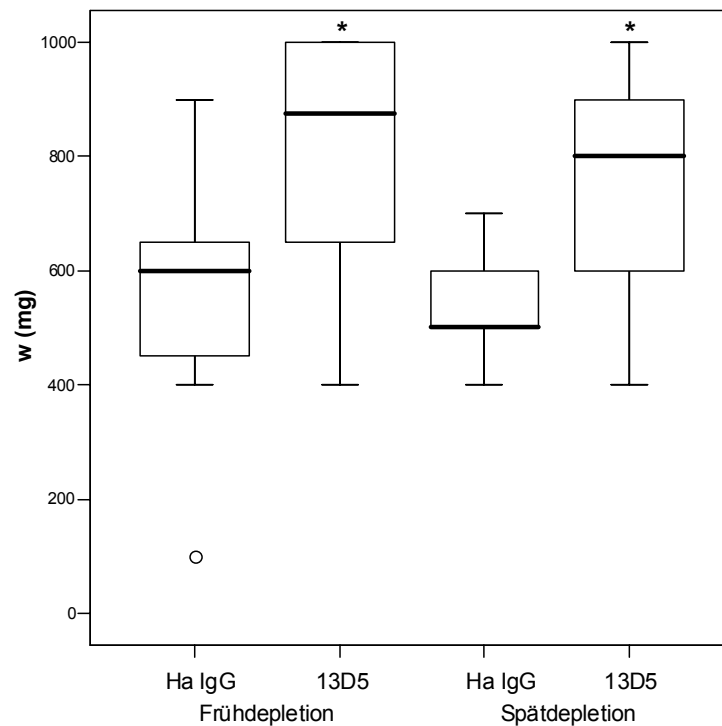


Abb. 12: **Ausgeprägte Splenomegalie bei IL-2 ko Mäusen infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion.** Gewichte w (mg) von Milzen von IL-2 ko Mäusen infolge Behandlung mit $\gamma\delta$ T-Zelldepletierendem mAk 13D5 und Kontrollantikörper Ha IgG (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen.

Splenozyten von IL-2 ko Mäusen sezernierten infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion (Früh- und Spätdepletion) geringere Mengen an IL-10 (Abb. 13). Zusätzlich führte die Frühdepletion zu einer erhöhten Sekretion von IFN- γ durch LPL. (Abb. 14A). Infolge Spätdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen war die IFN- γ -Sekretion stimulierter LPL statistisch

signifikant erhöht und die Sekretion von IL-10 erniedrigt (Abb. 14B). Die Sekretion der Zytokine TGF- β , TNF- α und IL-6 war infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion statistisch nicht signifikant verschieden. Das Zytokin IL-2 wurde nicht bestimmt, da die Tiere für dieses Zytokin eine Defizienz besaßen.

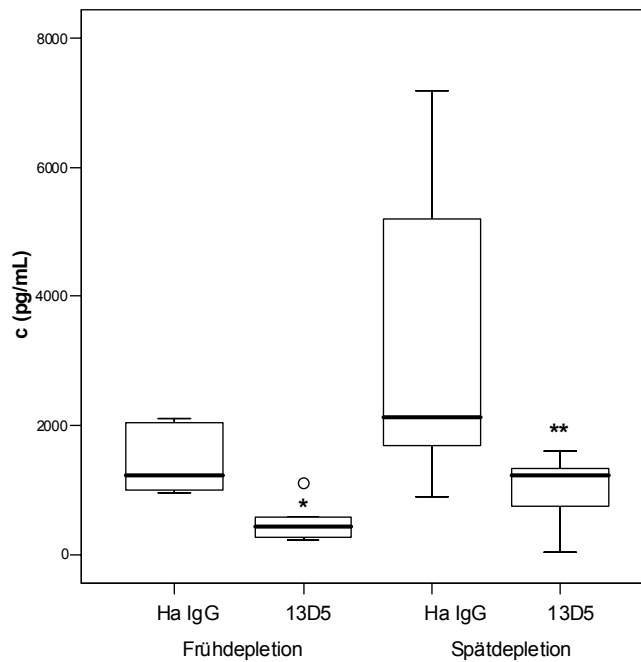


Abb. 13: Erniedrigte IL-10-Sekretion von Splenozyten infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Konzentration c (pg/mL) von IL-10 im Kulturüberstand stimulierter Splenozyten von IL-2 ko Mäusen infolge Behandlung mit $\gamma\delta$ T-Zelldepletierendem mAk 13D5 und Kontrollantikörper Ha IgG (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

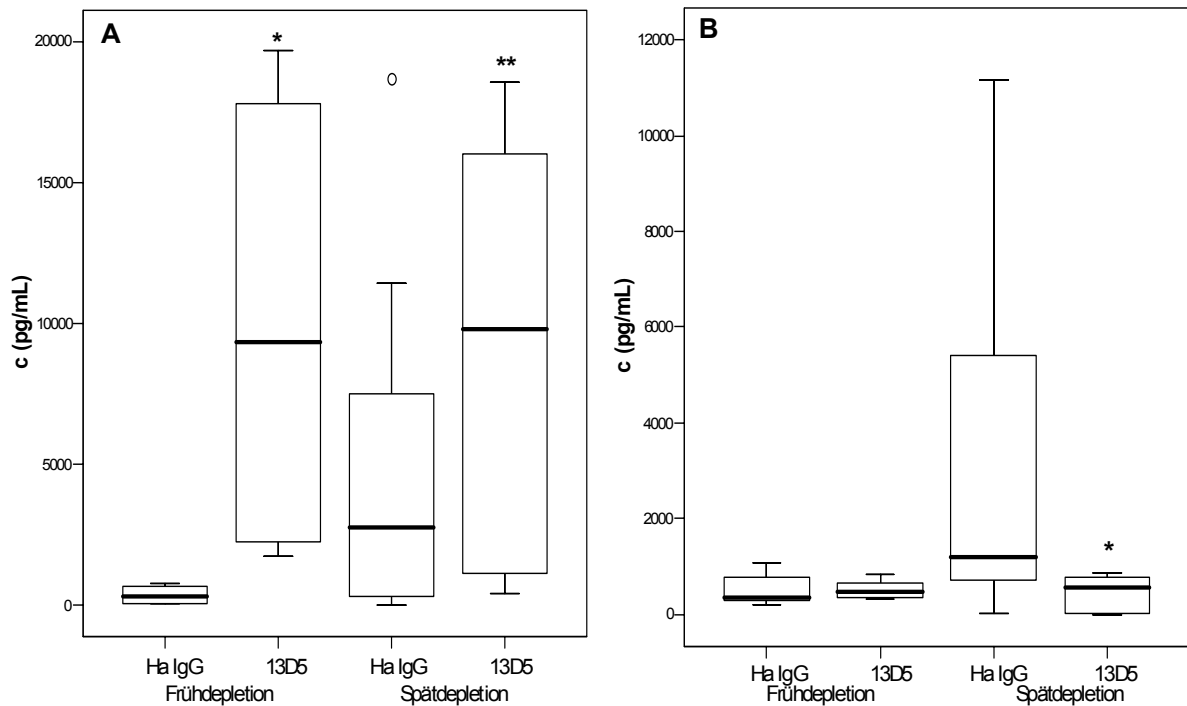


Abb. 14: LPL sezernierten vermehrt IFN- γ , aber vermindert IL-10 infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Konzentration c (pg/mL) von (A) IFN- γ und (B) IL-10 im Kulturüberstand stimulierter LPL nach Behandlung von IL-2 ko Mäusen mit Kontrollantikörper Ha IgG und $\gamma\delta$ T-Zelldepletierendem mAk 13D5 (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

Die Erstellung eines Hämogramms von IL-2 ko Mäusen zu Beginn, während und nach Abschluss des Versuchs zeigte zwar eine Abnahme der Leukozytenzahl infolge Frühdepletion von $\gamma\delta$ T-Zellen, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Die mittlere Leukozytenzahl (\pm STABW) $\gamma\delta$ T-Zell depletierter Mäuse betrug $4.800 \pm 4.122/\mu\text{L}$ im Vergleich zu $9.980 \pm 3.258/\mu\text{L}$ bei Kontrolltieren ($P = 0,053$). Die Spätdepletion der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Leukozytenzahl, jedoch eine erhöhte Thrombozytenzahl. Die mittlere Thrombozytenzahl (\pm STABW) $\gamma\delta$ T-Zell depletierter Tiere betrug $700.000 \pm 399.000/\mu\text{L}$ im Vergleich zu $253.000 \pm 192.000/\mu\text{L}$ bei Kontrolltieren ($P < 0,05$).

4.4 $\gamma\delta$ T-Zelldepletion im immunologischen Crohn-Modell der $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ Maus

Um den Einfluss von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Entstehung und den Verlauf einer intestinalen Entzündung vom Phänotyp eines Morbus Crohn zu untersuchen, erfolgte die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen in heterozygoten $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ Mäusen (n = 23) ab der vierten Lebenswoche (bei CED-Entstehung) bis zur 12. Lebenswoche. Kontrolltiere erhielten nach dem gleichen Behandlungsschema Ha IgG (n = 21). Die Tiere wurden bis zur 14. Lebenswoche beobachtet und nachfolgend getötet.

Die durchflusszytometrische Überprüfung der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion mittels FITC-markierten anti- $\gamma\delta\text{TCR}$ mAk GL3 ergab eine Reduktion der $\gamma\delta \text{TCR}^+$ -Splenozyten um 85% (Daten nicht gezeigt). Obwohl sich die heterozygoten $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ Mäuse klinisch unauffällig entwickelten (keine Zeichen einer Colitis, Gewichtszunahme um durchschnittlich 24%), wiesen die Tiere eine terminale Ileitis auf, die histologisch infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion eine schwerere Ausprägung zeigte (Abb. 15). Die histologische Beurteilung der Sektionen von Ileum, Zökum und Kolon ergab einen erhöhten Ileum-Score (Abb. 16), jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied bei Zökum und Kolon infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion.

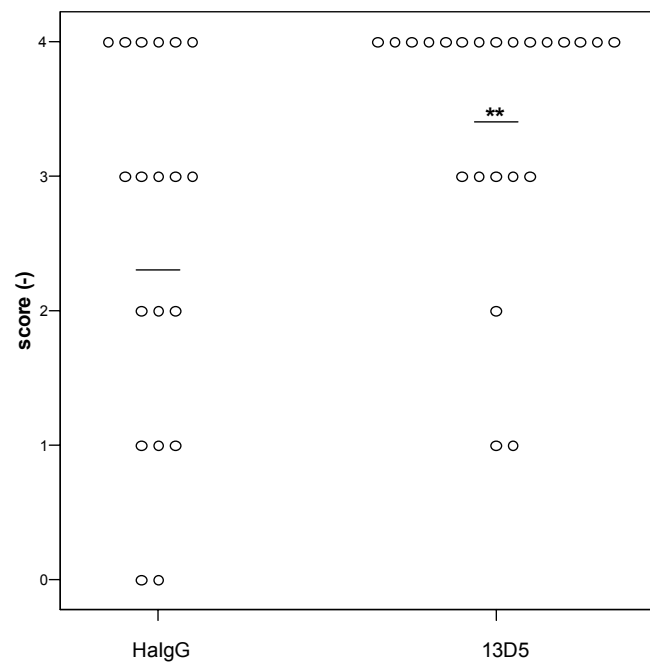
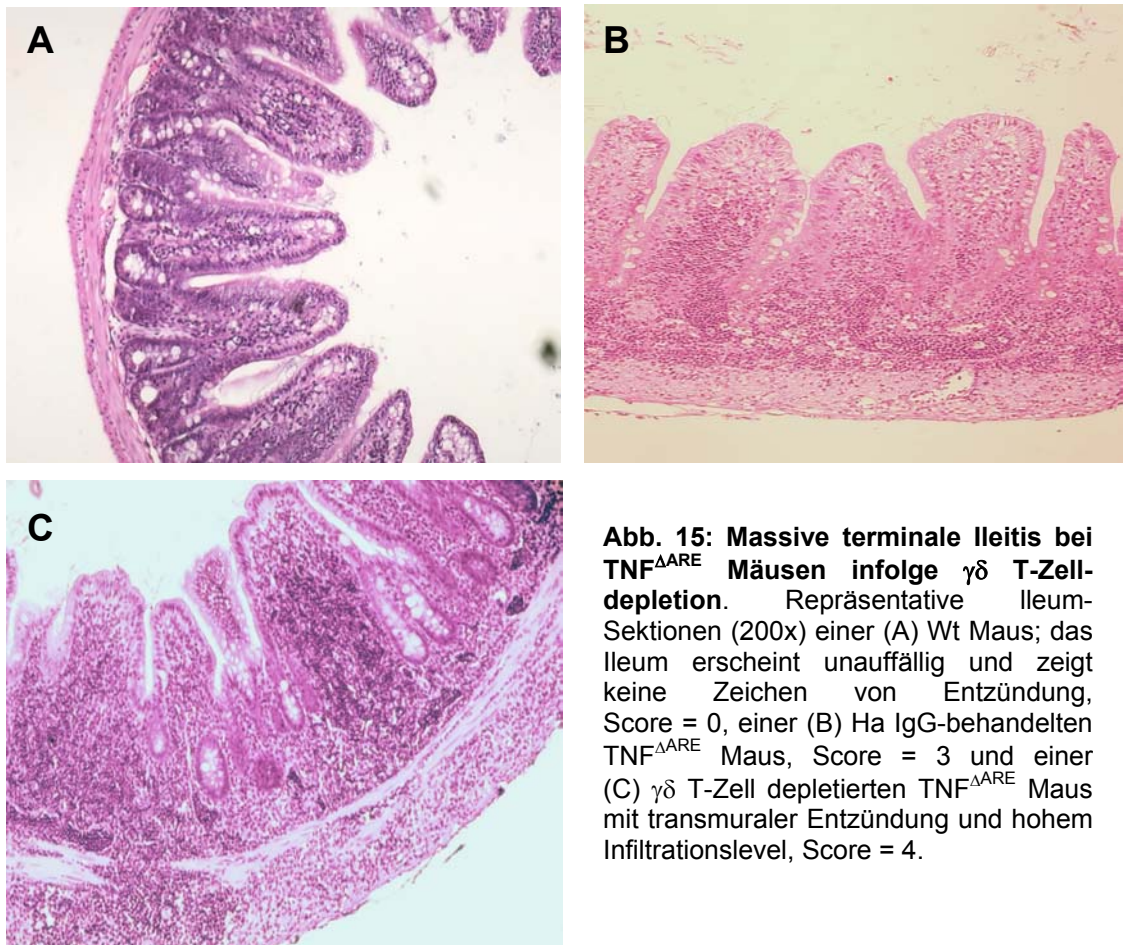


Abb. 16: Erhöhter histologischer Score des Ileums infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Histologische Scores (-) von Ileumsektionen von $TNF^{\Delta ARE}$ Mäusen infolge Ha IgG- und 13D5-Behandlung (—: Mittelwert); $**P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

Ein Übergreifen der Entzündung vom terminalen Ileum auf das Zökum und proximale Kolon hat in der vorliegenden Versuchsanordnung (Tötung der Tiere in der 14. Lebenswoche) nicht stattgefunden. Die histologische Beurteilung von Zökum- und Kolonsektionen zeigte daher nur eine milde Entzündung in beiden Organen (Tab. 3).

Tab. 3: TNF^{ΔARE} Mäuse wiesen keine Colitis, sondern terminale Ileitis auf. Mittlerer histologischer Score (± STABW) von Zökum- und Kolonsektionen Ha IgG-behandelter Kontrolltiere und $\gamma\delta$ T-Zell depletierter TNF^{ΔARE} Mäuse; Werte sind statistisch nicht signifikant verschieden (^{n.s.}).

| Score (-) | Kontrolle | $\gamma\delta$ T-Zelldepletion |
|-----------|-----------|--------------------------------|
| Zökum | 0,6 ± 0,7 | 0,8 ± 0,5 ^{n.s.} |
| Kolon | 0,4 ± 0,5 | 0,5 ± 0,5 ^{n.s.} |

Da die Entzündung bei TNF^{ΔARE} Mäusen im Ileum vorherrschte, wurden LPL aus dem Ileum isoliert. Ileale LPL (iLPL) aus $\gamma\delta$ T-Zell depletieren Tieren zeigten eine erhöhte Sekretion an IFN- γ sowie eine erniedrigte Sekretion an IL-10 und TGF- β (Tab. 4). Auch im Kulturüberstand stimulierter Splenozyten von $\gamma\delta$ T-Zell depletieren TNF^{ΔARE} Mäusen fanden sich geringere Mengen an TGF- β als bei Kontrolltieren (Tab. 4). Das Zytokinprofil stimulierter mLKL hingegen zeigte infolge $\gamma\delta$ T-Zell-depletion eine erhöhte Sekretion von IFN- γ und IL-10, während die Sekretion von TGF- β erniedrigt war (Tab. 4).

Tab. 4: Vermehrt proinflammatorische und vermindert antiinflammatorische Zytokine bei TNF^{ΔARE} Mäusen infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion. Mittlere Konzentration (\pm STABW) von Th2- (IL-10) und Th1- (IFN- γ) Zytokinen sowie des Wachstumsfaktors TGF- β im Zellkulturüberstand von TNF^{ΔARE} Mäusen infolge Behandlung mit Ha IgG (Kontrolle) und 13D5 ($\gamma\delta$ T-Zelldepletion).

| Zellen | Behandlung | IL-10 (pg/mL) | TGF- β (pg/mL) | IFN- γ (ng/mL) |
|---------|------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|
| iLPL | Ha IgG | 1.150 \pm 1.088 | 408 \pm 143 | 1,3 \pm 2,0 |
| | 13D5 | 18,4 \pm 10,0** | n.d.** | 7,7 \pm 9,8** |
| Splenos | Ha IgG | 1.763 \pm 877 | 346 \pm 22,5 | 29,5 \pm 24,0 |
| | 13D5 | 1.710 \pm 1.592 | 73,7 \pm 56,0** | 30,8 \pm 4,7 [#] |
| mLKL | Ha IgG | 520 \pm 264 | 542 \pm 134 | 13,7 \pm 13,4 |
| | 13D5 | 1.134 \pm 914* | 208 \pm 171** | 27,5 \pm 24,4* |

[#]P < 0,1, *P < 0,05 und **P < 0,01 im Vergleich zu Kontrollen, n.d. (nicht detektiert)

4.5 $\gamma\delta$ T-Zelldepletion bei IFN- γ ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis

Da die Untersuchungen zur Depletion/Defizienz von $\gamma\delta$ T-Zellen in den verschiedenen CED-Modellen auf eine mögliche Beteiligung der $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Regulation der Sekretion des Th1-Zytokins IFN- γ hindeuten, wurde in einem Folgeversuch dieser Mechanismus näher untersucht. Es wurde die Entstehung und der Verlauf einer DSS-induzierten Colitis bei IFN- γ ko Mäusen infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion (n = 12) verfolgt. Die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen begann mit Colitisinduktion an Tag 0. Kontrolltiere (n = 10) erhielten nach dem gleichen Behandlungsschema Ha IgG. Der Beobachtungszeitraum betrug 10 Tage, nachfolgend wurden die Tiere getötet.

In den ersten zwei Tagen entwickelten sich sowohl die $\gamma\delta$ T-Zell depletierten als auch die Kontrolltiere normal und unauffällig. Ab dem dritten Behandlungstag wiesen beide Behandlungsgruppen teilweise blutige Diarrhoe auf sowie einen stetigen und konstanten Gewichtsverlust, in dessen Folge ab dem 7. Tag Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten. Bezüglich der Überlebensrate bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen $\gamma\delta$ T-Zell depletierten und Ha IgG-behandelten IFN- γ ko Mäusen (Abb. 17).

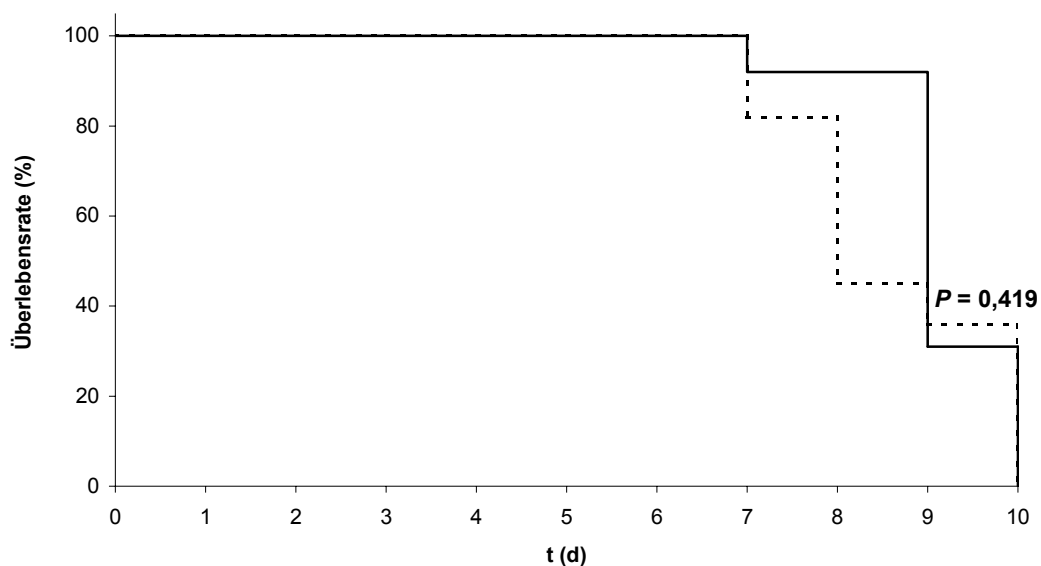


Abb. 17: $\gamma\delta$ T-Zelldepletion zeigte keinen Einfluss auf die Mortalität. Kaplan-Meier-Darstellung der Überlebensrate (%) bei IFN- γ ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion (—) und Behandlung mit Ha IgG (----).

Makroskopisch wie histologisch wiesen beide Behandlungsgruppen eine schwerwiegende Entzündung des Kolons auf, die allerdings von der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion nicht beeinflusst wurde. So waren die Scores in beiden Gruppen erhöht, aber nicht statistisch signifikant verschieden (Abb. 18). Obwohl sich in beiden Behandlungsgruppen Kolonverkürzungen zeigten, war die Kolonlänge bei $\gamma\delta$ T-Zell depletierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nicht statistisch signifikant verschieden. Die mittlere Kolonlänge (\pm STABW) $\gamma\delta$ T-Zell depletierter IFN- γ ko Mäuse betrug $4,5 \pm 0,8$ cm im Vergleich zu $4,5 \pm 1,3$ cm bei Ha IgG-behandelten Kontrolltieren ($P = 0,360$).

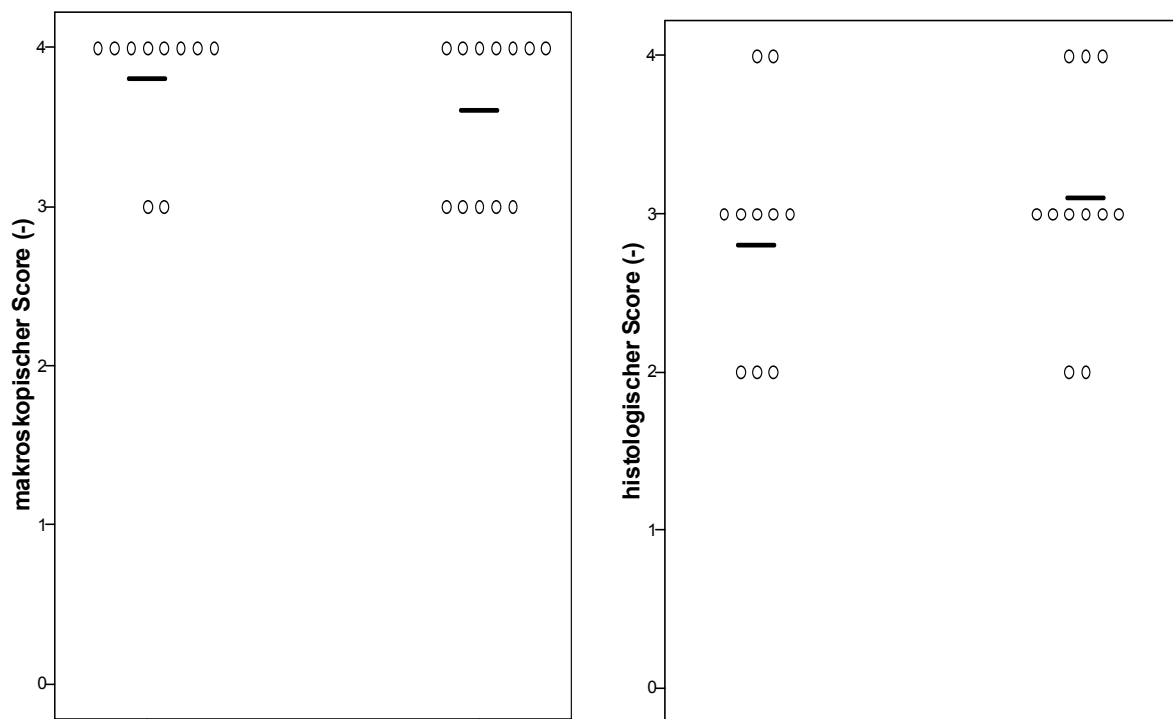


Abb. 18: $\gamma\delta$ T-Zelldepletion zeigte keinen Einfluss auf den makroskopischen oder histologischen Score. Makroskopische und histologische Kolon-Scores (-) von IFN- γ ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis infolge Behandlung mit Ha IgG (Kontrolle) und 13D5 ($\gamma\delta$ T-Zelldepletion).

Weiterhin zeigte die $\gamma\delta$ T-Zelldepletion keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zytokinsekretion der LPL und mLKL. Sowohl Th1-Zytokine wie IL-2, IL-6 und TNF- α als auch Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-10 sowie der Wachstumsfaktor TGF- β blieben von der Depletion in diesem Modell unberührt (Abb. 19). IFN- γ wurde im ELISA nicht nachgewiesen, da die Mäuse für dieses Zytokin eine Defizienz besaßen.

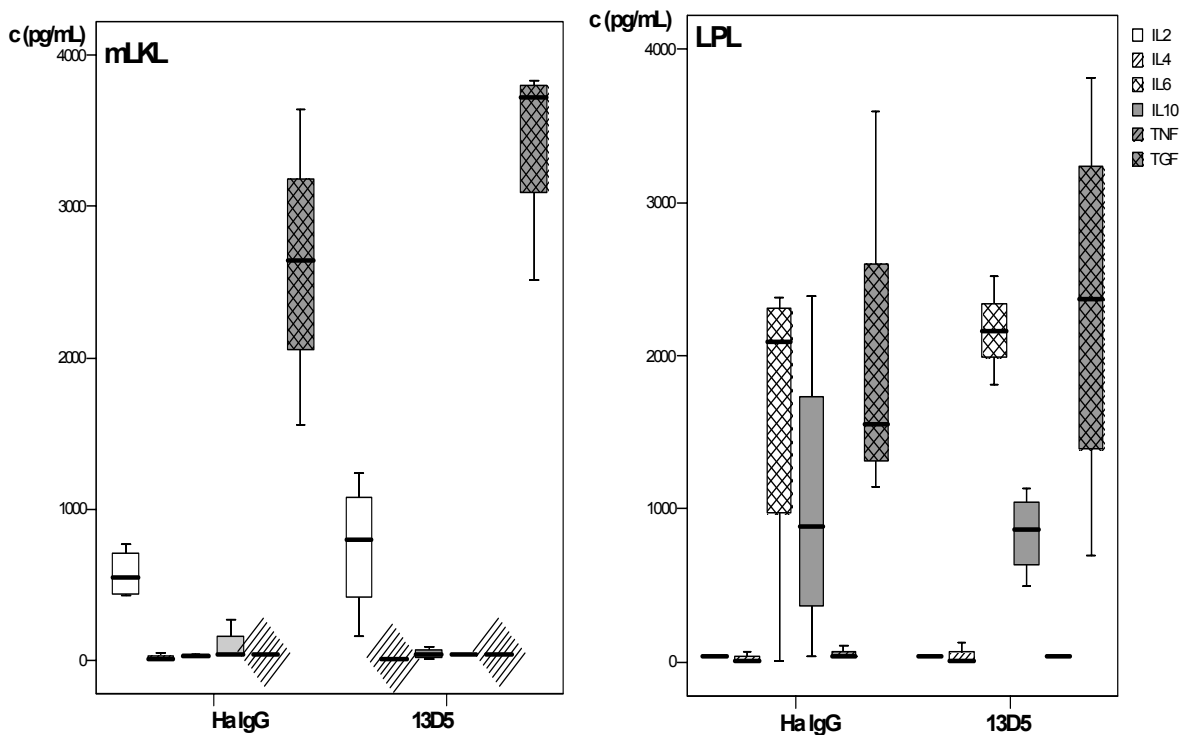


Abb. 19: Die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine blieb von der $\gamma\delta$ T-Zelldepletion unbeeinflusst. Zytokinkonzentrationen c (pg/mL) bei IFN- γ ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis infolge Behandlung mit Kontrollantikörper Ha IgG und $\gamma\delta$ T-Zell depletierendem mAk 13D5.

Die $\gamma\delta$ T-Zelldepletion zeigte ebenfalls im Hämogramm keinen statistisch signifikanten Einfluss hinsichtlich der Leukozyten- und Thrombozytenzahl oder dem Anteil an Lymphozyten und Neutrophilen im Differentialblutbild (Tab. 5).

Tab. 5: Die $\gamma\delta$ T-Zelldepletion zeigte keinen Einfluss auf Leukozyten- und Thrombozytenzahl bei IFN- γ ko Mäusen mit DSS-induzierter Colitis. Mittlere Zahl (\pm STABW) der Leukozyten (WBC) und Thrombozyten (PLT) sowie die Verteilung der Lymphozyten und Neutrophilen zu Versuchsende bei Kontrolltieren und $\gamma\delta$ T-Zell depletierten IFN- γ ko Mäusen; Werte sind statistisch nicht signifikant verschieden (^{n.s.}).

| Gruppe | WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | Lymphozyten (%) | Neutrophile (%) |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Kontrolle | 15,2 \pm 17,5 | 1.061 \pm 453 | 35 \pm 16 | 65 \pm 16 |
| $\gamma\delta$ T-Zelldepletion | 13,9 \pm 9,2 ^{n.s.} | 807 \pm 390 ^{n.s.} | 67 \pm 30 ^{n.s.} | 34 \pm 30 ^{n.s.} |

4.6 Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen in Mäuse mit TNBS-induzierter Colitis

Da die Depletion/Defizienz von $\gamma\delta$ T-Zellen in den bisher untersuchten Modellen zu einem schwereren Colitisverlauf führte, wurde nachfolgend der therapeutische Einsatz der $\gamma\delta$ T-Zellen im Transferversuch geprüft. Wildtyp (Wt) Mäusen wurden $\gamma\delta$ T-Zellen transferiert, um die Entstehung einer Colitis zu verhindern oder zumindest den Colitisverlauf günstig zu beeinflussen. Die transferierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurden entweder aus B6- oder aus IL-10 tg Mäusen isoliert. Der präventive Transfer erfolgte 6 Tage nach Sensibilisierung bzw. einen Tag vor Colitisinduktion, dabei erhielten Wt Mäuse 5×10^5 $\gamma\delta$ T-Zellen von B6-Spendern ($n = 8$) und IL10 tg-Spendern ($n = 7$). Eine dritte Gruppe, sogenannte Sham Mäuse bekamen keine $\gamma\delta$ T-Zellen transferiert ($n = 7$). Der $\gamma\delta$ T-Zelltransfer bei etablierter Colitis (ebenfalls 5×10^5 $\gamma\delta$ T-Zellen pro Rezipient) erfolgte zwei Tage nach Colitisinduktion. Hierbei erhielten jeweils 9 Wt Mäuse $\gamma\delta$ T-Zellen von B6- bzw. IL10 tg-Spendern und 10 Tiere blieben untransferiert (Sham-Gruppe).

Für den Zelltransfer wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen aus Splenozyten und mLKL, die nach getrennter Aufreinigung gepoolt wurden, über verschiedene MACS- und FACS-Schritte isoliert, um Zellen von besonders hoher Reinheit zu erhalten. Nach Isolierung der Lymphozyten wurde eine Anreicherung der T-Zellen mittels MACS durchgeführt. Hierbei kam es zu einer ca. 4-fachen Anreicherung der $CD3^+$ T-Zellen (Abb. 20A). Anschließend wurden aus dieser Zellpopulation die $CD4^+$ T-Zellen mittels MACS zu 99% depletiert (Abb. 20B).

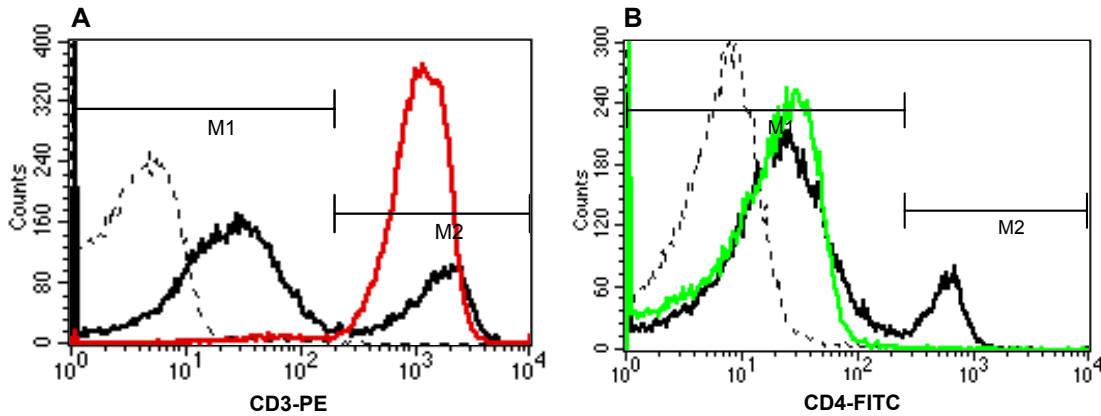


Abb. 20: Anreicherung von CD3⁺ und Depletion von CD4⁺ T-Zellen mittels MACS für die Isolierung muriner $\gamma\delta$ T-Zellen. Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von (A) CD3⁺ und (B) CD4⁺ T-Zellen nach MACS. Die gestrichelte schwarze Linie kennzeichnet jeweils die Isotypenkontrolle, die schwarze Linie die Verteilung in frisch isolierten Lymphozyten und die farbige Linie die Fraktion nach MACS, d.h. M1 umfasst die Negativpopulation und M2 die Positivpopulation. CD3⁺ T-Zellen wurden von M2 = 24,1% in frisch isolierten Lymphozyten auf M2 = 91,1% angereichert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Zellsuspension fast vollständig entfernt (von M2 = 10,4% auf M2 = 0,1%).

Nachfolgend wurden aus dieser CD3⁺CD4⁻ T-Zellsuspension $\gamma\delta$ TCR⁺ Lymphozyten mittels FACS sortiert, wodurch >99% reine $\gamma\delta$ T-Zellen für den Transfer gewonnen wurden (Abb. 21).

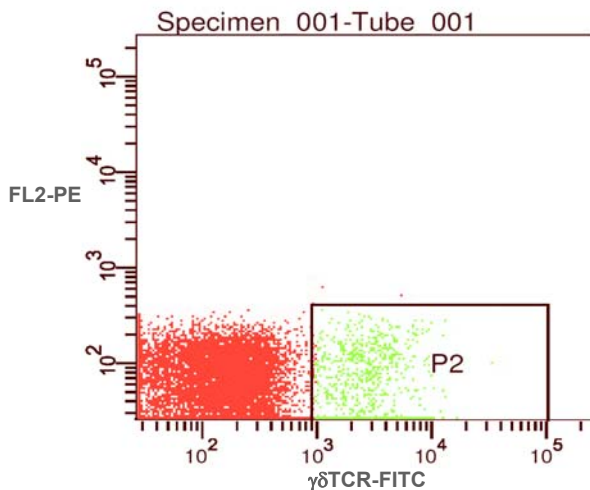


Abb. 21: Sortierung muriner $\gamma\delta$ T-Zellen am FACS. Dot Plot der durchflusszytometrischen Messung von FITC-markierten $\gamma\delta$ T-Zellen. Die P2-Population wurde aus der Zellsuspension sortiert, indem sie elektrisch geladen und im Magnetfeld in separaten Röhrcchen aufgefangen wurde. P2 enthält zu >99% $\gamma\delta$ TCR⁺ Lymphozyten.

Obwohl der $\gamma\delta$ T-Zelltransfer vor Colitisinduktion die Entstehung einer TNBS-induzierten Colitis nicht verhindern konnte, war ein abgemilderter Verlauf zu beobachten. Dies spiegelte sich als erstes im Gewichtsverlauf wider (Abb. 22). Mäuse, die $\gamma\delta$ T-Zellen von IL10 tg-Spendern erhalten hatten, verloren zwar in den ersten zwei Tagen nach Colitisinduktion an Gewicht, nahmen aber ab dem dritten Tag deutlich zu und erreichten bei Versuchsende im Durchschnitt $104 \pm 3\%$ ihres Ausgangsgewichts. Mäuse, die $\gamma\delta$ T-Zellen von B6-Spendern transferiert bekamen, verloren in den ersten drei Tagen nach Colitisinduktion ebenfalls deutlich an Gewicht, nahmen ab dem vierten Tag jedoch wieder zu und erreichten bei Versuchsende im Durchschnitt $90 \pm 16\%$ ihres Ausgangsgewichts. Die Mäuse, denen keine $\gamma\delta$ T-Zellen transferiert wurden (Sham-Gruppe) verloren infolge Colitisinduktion kontinuierlich an Gewicht und mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Daher zeigten Mäuse mit TNBS-induzierter Colitis infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer eine deutlich höhere Überlebensrate als untransferierte Tiere (Abb. 23).

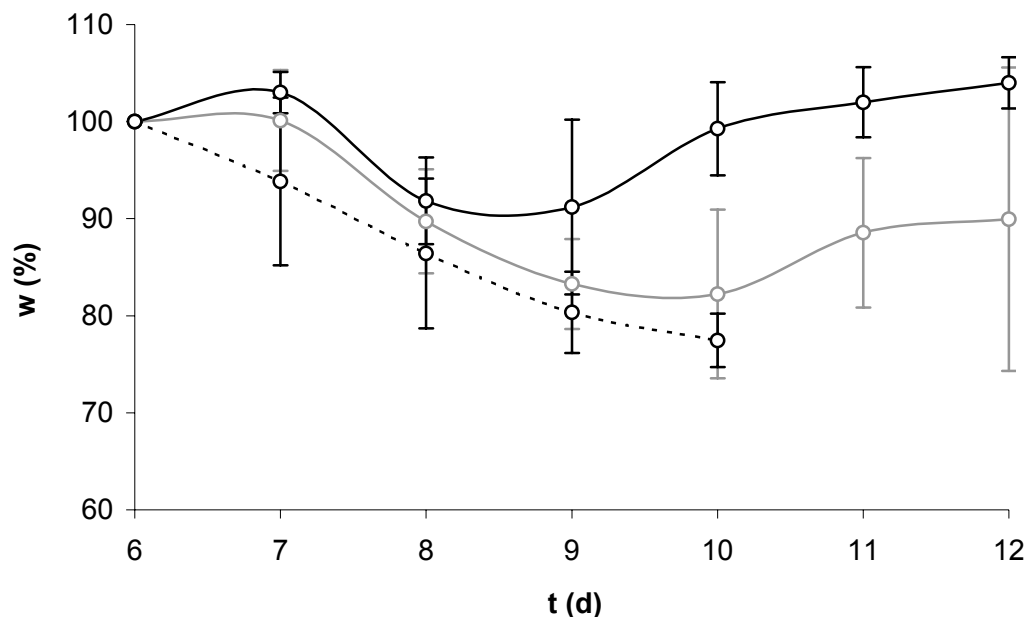


Abb. 22: Der Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflusste den Gewichtsverlauf von Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis positiv. Gewichtsverlauf (%) von Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis infolge Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen aus IL10 tg- (—○—) und B6- (—○—) Spendern sowie ohne Transfer (---○---).

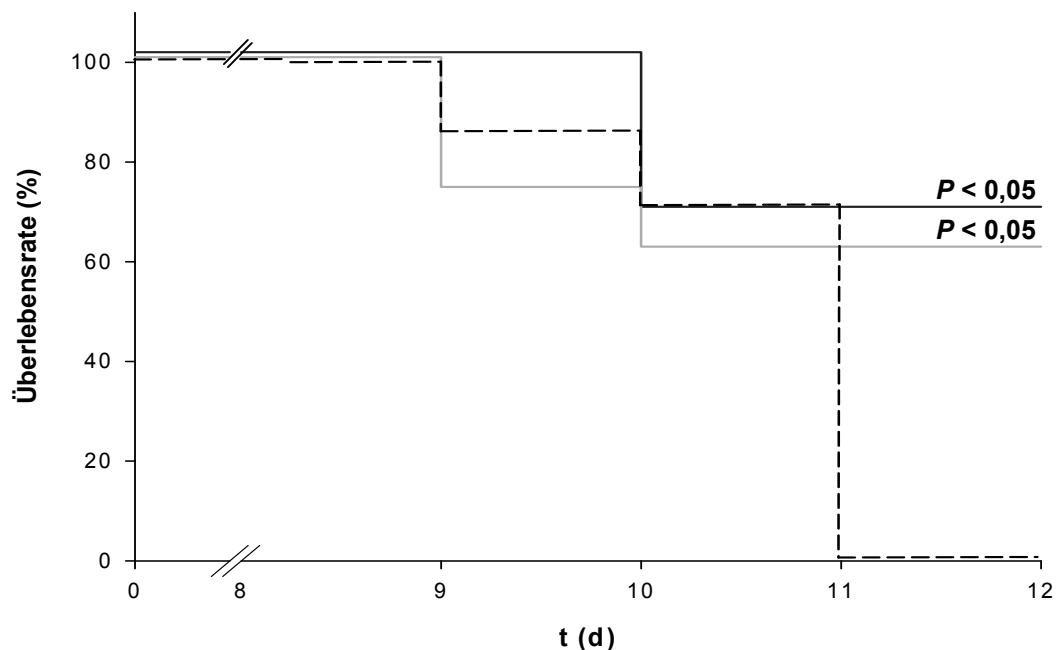


Abb. 23: Der Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen verlängerte bei Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis das Überleben. Kaplan-Meier-Darstellung der Überlebensrate (%) bei Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis infolge Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen aus IL10 tg- (—) und B6- (---) Spendern sowie ohne Transfer (----).

In der Sham-Gruppe war der rapide Gewichtsverlust und die erhöhte Mortalität assoziiert mit ausgeprägter intestinaler Gewebeschädigung. Makroskopisch zeigten diese Mäuse ein schwer geschädigtes Kolon mit maximalem makroskopischem Score, während Mäuse, denen $\gamma\delta$ T-Zellen transferiert wurden, eine mäßige makroskopische Schädigung aufwiesen. Dies spiegelt sich auch im histologischen Score wider. Während Sham Mäuse eine schwere feingewebliche Schädigung mit hohem Infiltrationslevel und Epithelverlust aufwiesen, zeigten Mäuse infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer lediglich ein mittleres Entzündungsinfiltrat und eine geringe Mukosaschädigung. Folglich sind der makroskopische und der histologische Score bei $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen im Vergleich zu Sham Mäusen statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 24). Zudem sind die Scores von Mäusen, die $\gamma\delta$ T-Zellen von IL10 tg-Spendertieren erhielten niedriger als die der Tiere, die $\gamma\delta$ T-Zellen von B6-Spendern erhielten, allerdings ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

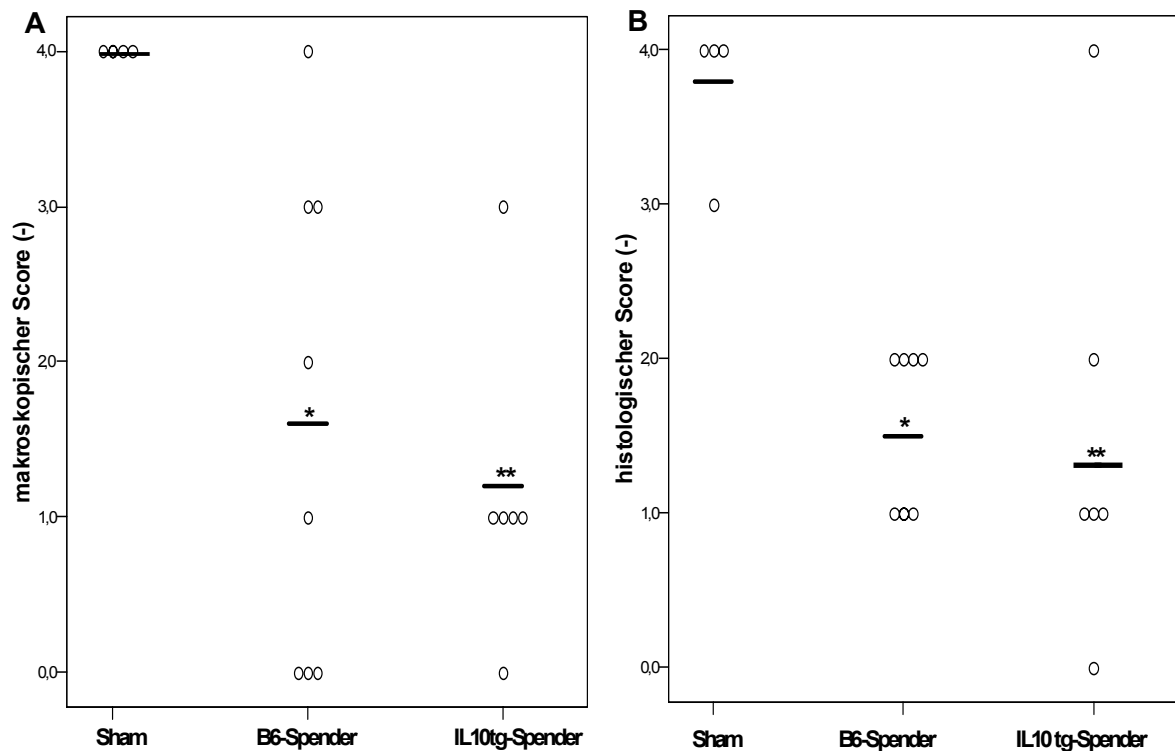


Abb. 24: Erniedrigte Scores infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer. Makroskopische (A) und histologische (B) Scores von Kontrolltieren (Sham) und $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen (aus B6- bzw. IL10 tg-Spendertieren) mit TNBS-induzierter Colitis (—, Mittelwerte); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

Das Kolon der untransferierten Sham Mäuse war im Vergleich zu dem der $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäuse verkürzt, wenn auch nur im Falle der Mäuse, die $\gamma\delta$ T-Zellen von IL10 tg-Spendern erhielten. Die mittlere Kolonlänge (\pm STABW) bei Sham Mäusen betrug $5,8 \pm 0,6$ cm im Vergleich zu $6,7 \pm 0,4$ cm bei $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Tieren ($P < 0,05$). Hinsichtlich des Zytokinprofils zeigten die transferierten Tiere eine erhöhte Sekretion von IL-10 und TGF- β durch LPL und Splenozyten (Abb. 25) sowie eine erniedrigte Sekretion von TNF- α durch mLKL, Splenozyten und LPL (Abb. 26).

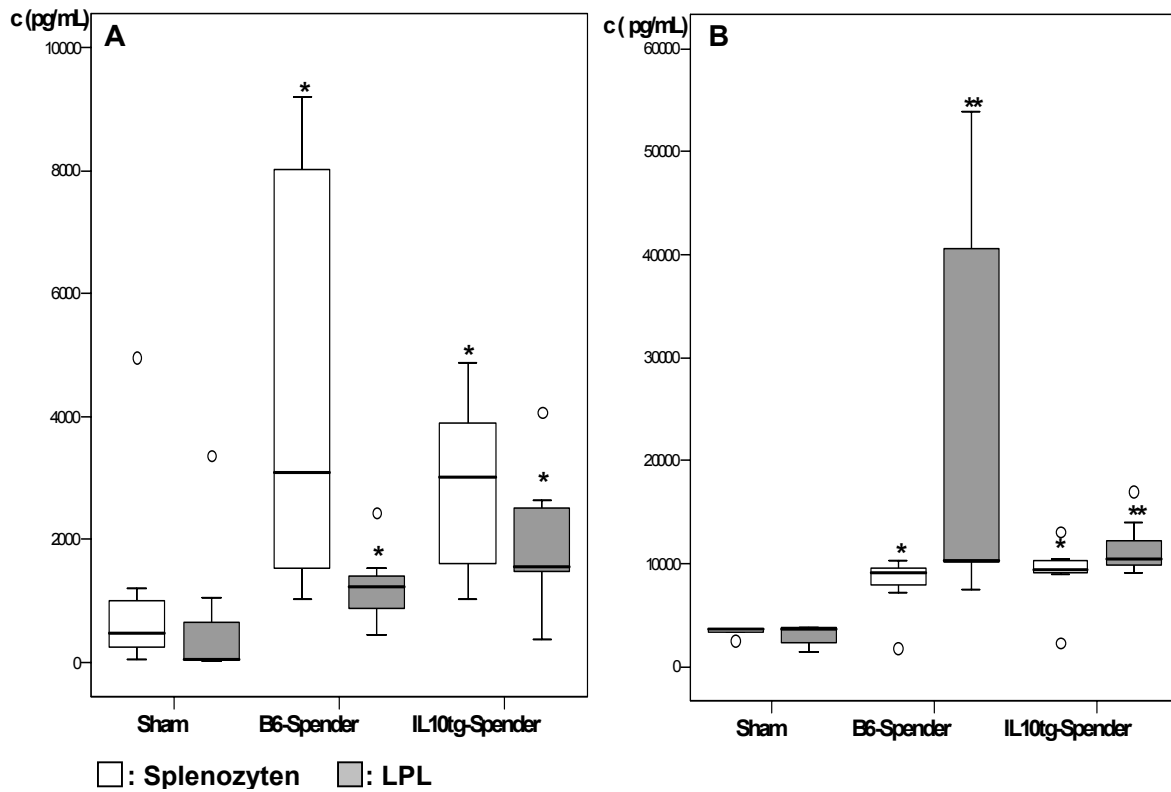


Abb. 25: Erhöhte Sekretion antiinflammatorischer Zytokine infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer. Konzentration c (pg/mL) von (A) IL-10 und (B) TGF- β von Splenozyten und LPL von Kontrolltieren (Sham) und $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen (aus B6- bzw. IL10 tg-Spendertieren) mit TNBS-induzierter Colitis (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

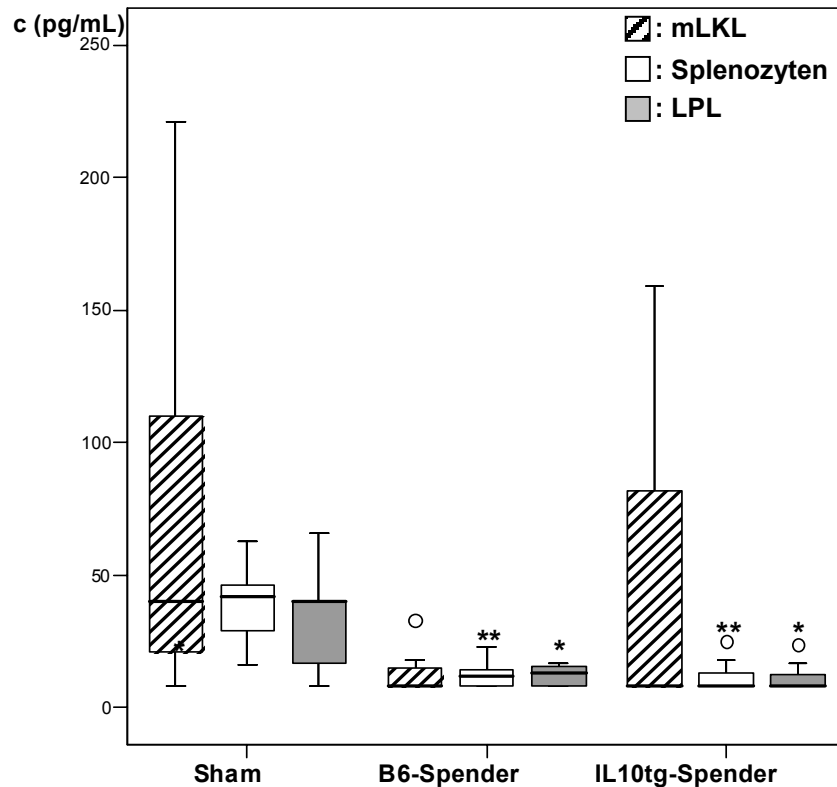


Abb. 26: **Erniedrigte TNF- α -Sekretion infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer.** TNF- α -Konzentration c (pg/mL) von mLKL, Splenozyten und LPL von Kontrolltieren (Sham) und $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen (aus B6- bzw. IL10 tg-Spendertieren) mit TNBS-induzierter Colitis (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

Der Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen bei etablierter Colitis zeigte allerdings keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Gewichtsverlauf oder die Überlebensrate (Abb. 27) der Tiere. In allen drei Versuchsgruppen, d.h. auch in der Sham-Gruppe, kam es am dritten Tag nach Colitisinduktion zur Gewichtszunahme, und bei Versuchsende hatten alle Gruppen im Durchschnitt ihr Ausgangsgewicht nahezu wieder erreicht.

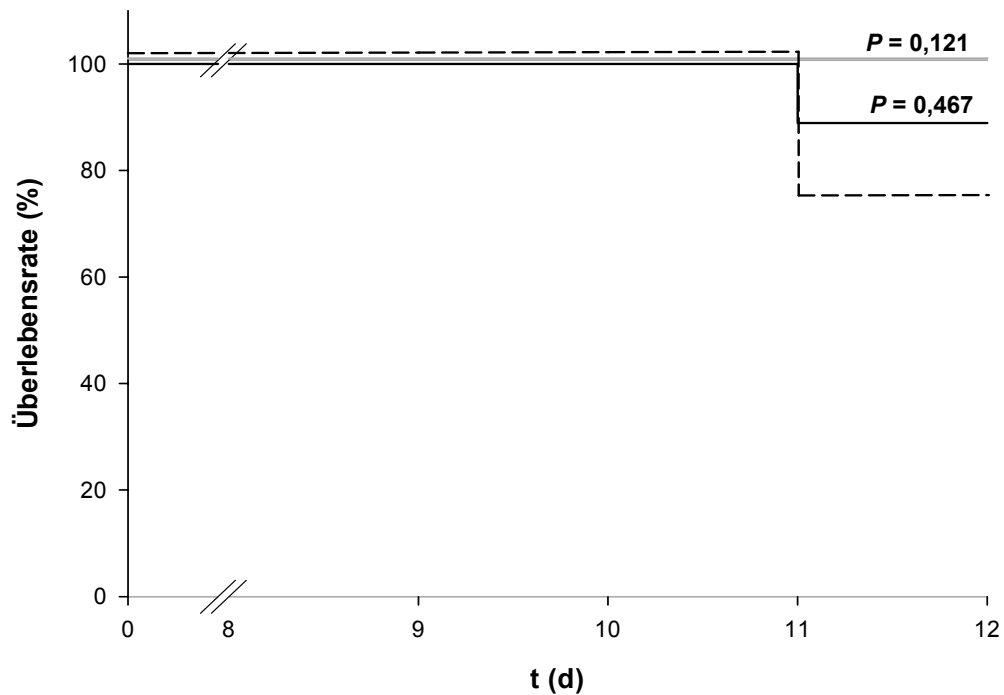


Abb. 27: Der $\gamma\delta$ T-Zelltransfer bei etablierter Colitis zeigte keinen Einfluss auf die Überlebensrate. Kaplan-Meier-Darstellung der Überlebensrate (%) bei Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer aus IL10 tg-Spendern (—) und B6-Spendern (—) sowie ohne Transfer (----).

Der makroskopische Score ist zwischen den transferierten Tieren (B6-Spender vs. IL10 tg-Spender) nicht statistisch signifikant verschieden, jedoch deutlich geringer als bei untransferierten Tieren (Abb. 28A). Dies spiegelt sich auch im histologischen Score wider (Abb. 28B).

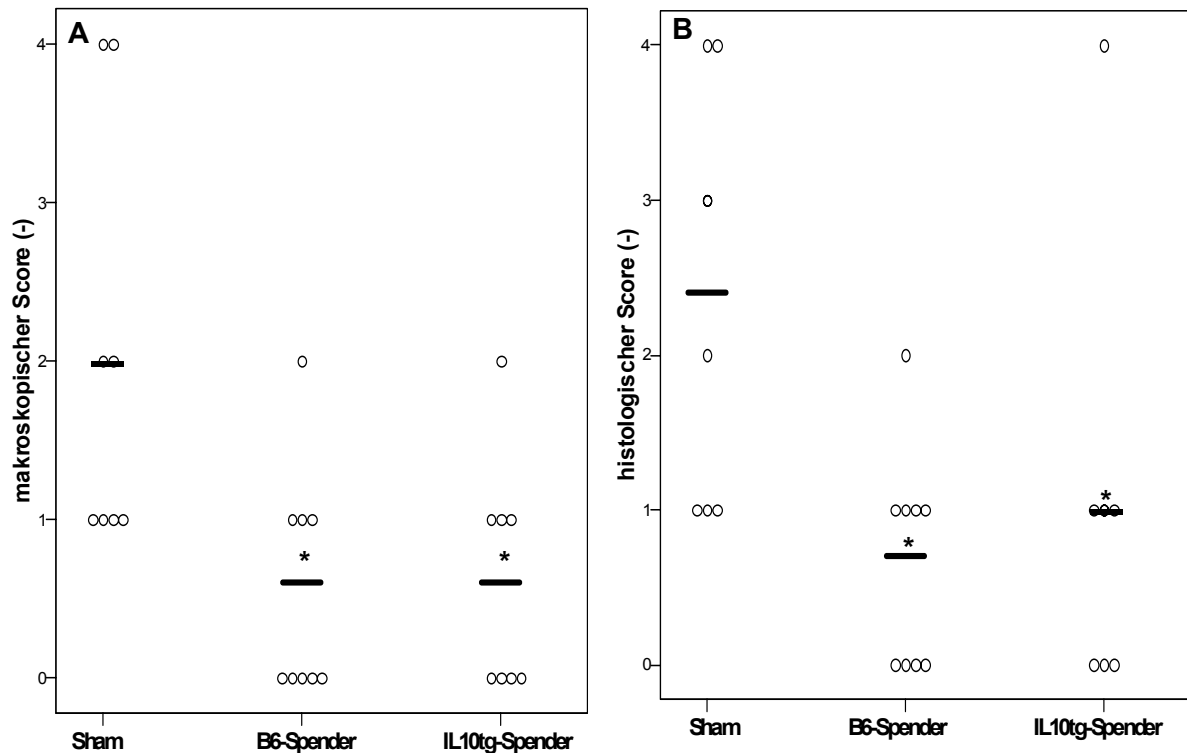


Abb. 28: **Erniedrigte Scores infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer bei etablierter Colitis.** Makroskopische (A) und histologische (B) Scores von Kontrolltieren (Sham) und $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen (aus B6- bzw. IL10 tg-Spendertieren) mit TNBS-induzierter Colitis (—, Mittelwerte); * $P < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen.

Das Zytokinprofil ähnelt dem des vorherigen Versuches (präventiver $\gamma\delta$ T-Zelltransfer vor Colitisinduktion): Wt Mäuse zeigten infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer eine erhöhte Sekretion der Zytokine IL-10 und TGF- β (Abb. 29) und eine erniedrigte Sekretion von TNF- α (Abb. 30). Allerdings war auch die Sekretion von IFN- γ durch mLKL erhöht. Während mLKL von Sham-Tieren nur $2,5 \pm 2,3$ ng/mL IFN- γ sezernierten, sekretierten mLKL von Mäusen nach $\gamma\delta$ T-Zelltransfer $6,0 \pm 2,0$ ng/mL IFN- γ (B6; $P < 0,01$) bzw. $5,1 \pm 2,6$ ng/mL IFN- γ (IL10 tg; $P < 0,05$). Die IFN- γ -Sekretion von Splenozyten und LPL war jedoch nicht statistisch signifikant verschieden zwischen den Behandlungsgruppen.

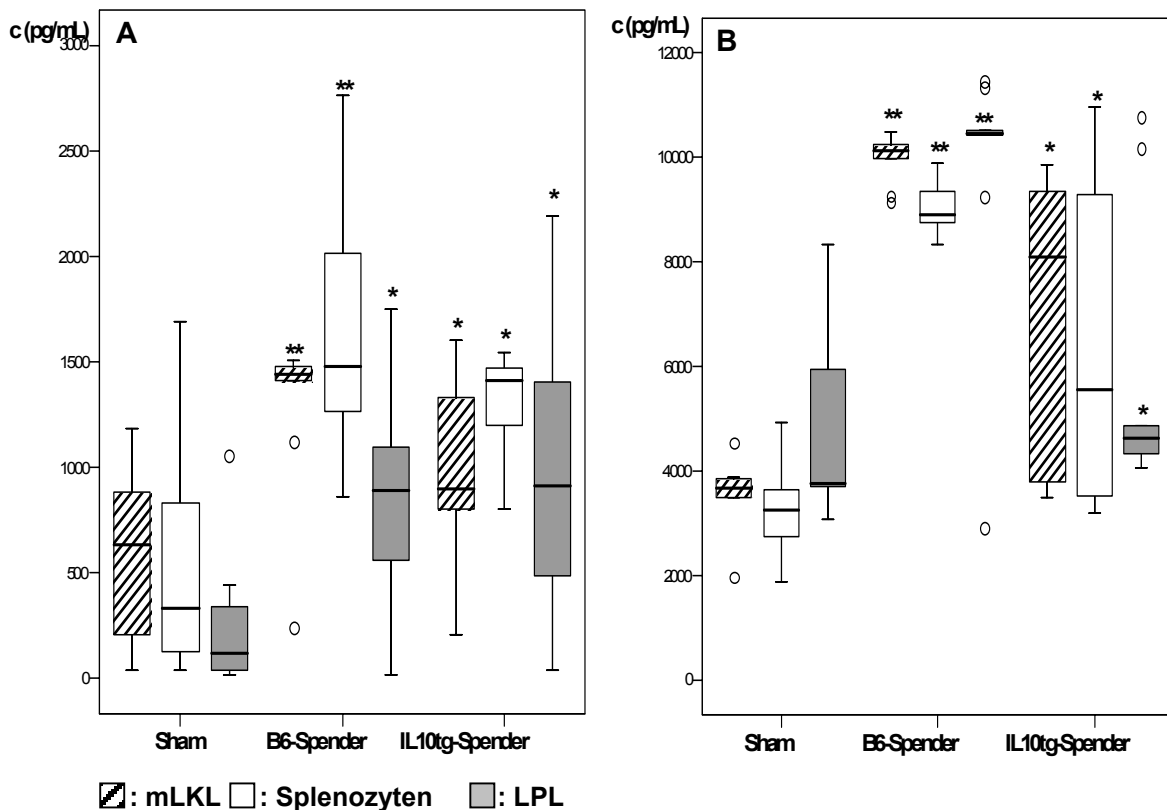


Abb. 29: Erhöhte Sekretion antiinflammatorischer Zytokine infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer bei etablierter Colitis. Konzentration c (pg/mL) von (A) IL-10 und (B) TGF- β von mLKL, Splenocyten und LPL von Kontrolltieren (Sham) und $\gamma\delta$ T-Zelltransferierten Mäusen (aus B6- bzw. IL10 tg-Spendertieren) mit TNBS-induzierter Colitis (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

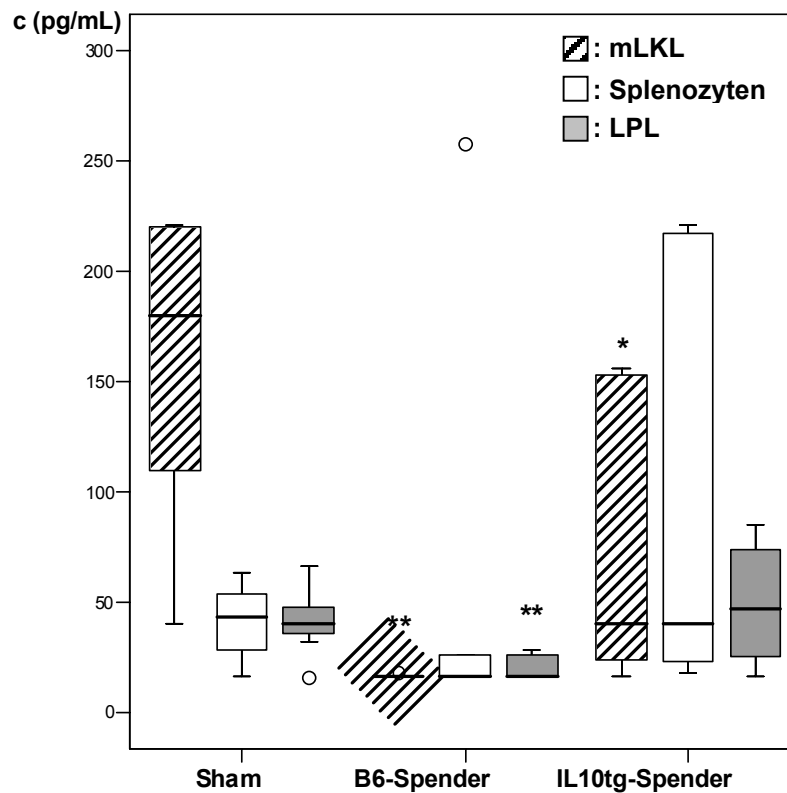


Abb. 30: Erniedrigte Sekretion von TNF- α infolge $\gamma\delta$ T-Zelldepletion bei etablierter Colitis. TNF- α -Konzentration c (pg/mL) von mLKL, Splenozyten und LPL von Kontrolltieren (Sham) und $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen (aus B6- bzw. IL10 tg-Spendertieren) mit TNBS-induzierter Colitis (O: Ausreisser); * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen. Die Splenozyten von Mäusen infolge B6- $\gamma\delta$ T-Zelltransfer zeigen einen Trend ($P = 0,098$) zu verminderter TNF- α -Sekretion im Vergleich zur Sham-Gruppe.

Hinsichtlich der Proliferationsrate von mLKL, Splenozyten und LPL gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen und Kontrolltieren. Allerdings zeigte sich auch im Blutbild, dass Sham Tiere eine schwerere Entzündung aufwiesen als die transferierten Mäuse (Tab. 6). Die Zahl der Leukozyten und auch der Thrombozyten war in $\gamma\delta$ T-Zell transferierten Mäusen signifikant erniedrigt. Entsprechend waren die neutrophilen Granulozyten im Trend ($P \leq 0,1$) erniedrigt und die Lymphozyten erhöht.

Tab. 6: Erniedrigte Leukozyten- und Thrombozytenzahl bei Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis infolge $\gamma\delta$ T-Zelltransfer. Mittlere Zahl (\pm STABW) der Leukozyten (WBC) und Thrombozyten (PLT) sowie Verteilung der Lymphozyten und Neutrophilen zu Versuchsende in der Sham-Gruppe und nach $\gamma\delta$ T-Zelltransfer.

| Gruppe ($\gamma\delta$ T-Zelltransfer aus) | WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | Lymphozyten (%) | Neutrophile (%) |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| untransferiert (Sham) | 9,3 \pm 4,0 | 1.175 \pm 25 | 51 \pm 19 | 49 \pm 21 |
| B6-Mäusen | 6,8 \pm 0,7 [#] | 933 \pm 275* | 70 \pm 14 [#] | 26 \pm 15 [#] |
| IL10tg-Mäusen | 6,5 \pm 1,0* | 1.078 \pm 52** | 68 \pm 19 ^{n.s.} | 29 \pm 19 ^{n.s.} |

[#] $P \leq 0,1$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bzw. nicht statistisch signifikant (n.s.) im Vergleich zur Sham-Gruppe

4.7 *In vitro*-Generierung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen

Da sich eine protektive Wirkung der $\gamma\delta$ T-Zellen bei CED im Tiermodell zeigte, stellte sich nachfolgend die Frage nach einer $\gamma\delta$ T-Zell basierenden Immuntherapie. Hierbei können zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden: zum einen die Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen *in vivo*, zum anderen der $\gamma\delta$ T-Zelltransfer nach *ex vivo*-Isolierung und *in vitro*-Stimulation und -Expansion.

In einem ersten Schritt wurden humane $\gamma\delta$ T-Zellen, die mittels MACS aus PBL gesunder Spender isoliert wurden, *in vitro* charakterisiert (Proliferation, Suppression und Zytokinsekretion). Nachfolgend wurden verschiedene Expansionsmethoden zur *in vitro*-Generierung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen getestet. Eine optimale Expansionsmethode zeichnet sich durch eine hohe Zellausbeute unter Beibehaltung des regulatorischen Phänotyps der $\gamma\delta$ T-Zellen aus.

4.7.1 Eigenschaften humaner $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro*

Humane $\gamma\delta$ T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut verschiedener Spender (gesunde, männliche und weibliche Probanden mittleren Alters) mittels Dichtegradientenzentrifugation und MACS gewonnen. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 31) und nur $\gamma\delta$ T-Zellen mit >98% Reinheit wurden kultiviert und stimuliert.

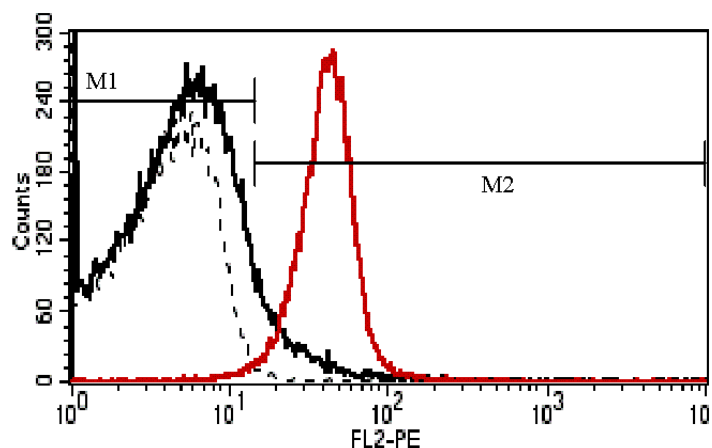


Abb. 31: Durchflusszytometrische Kontrolle der $\gamma\delta$ T-Zellaufreinigung mittels MACS aus humanen PBL. Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von humanen PBL (schwarze Linie; M2 = 5,19%) und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Positivselektion mittels MACS (rote Linie; M2 = 98,5%) mit PE-markiertem anti- $\gamma\delta$ TCR mAk; gestrichelte Linie = Isotypenkontrolle (M2 = 0,37%).

Im Proliferations-Assay zeigte sich, dass $\gamma\delta$ T-Zellen anerg sind. Infolge Stimulation via anti-CD3/CD28 zeigten sie eine weitaus geringere Proliferationsantwort als PBL. Die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen konnte zwar durch die Zugabe von rekombinatem Interleukin 2 (rIL-2) leicht gesteigert, die Anergie jedoch nicht aufgehoben werden (Abb. 32).

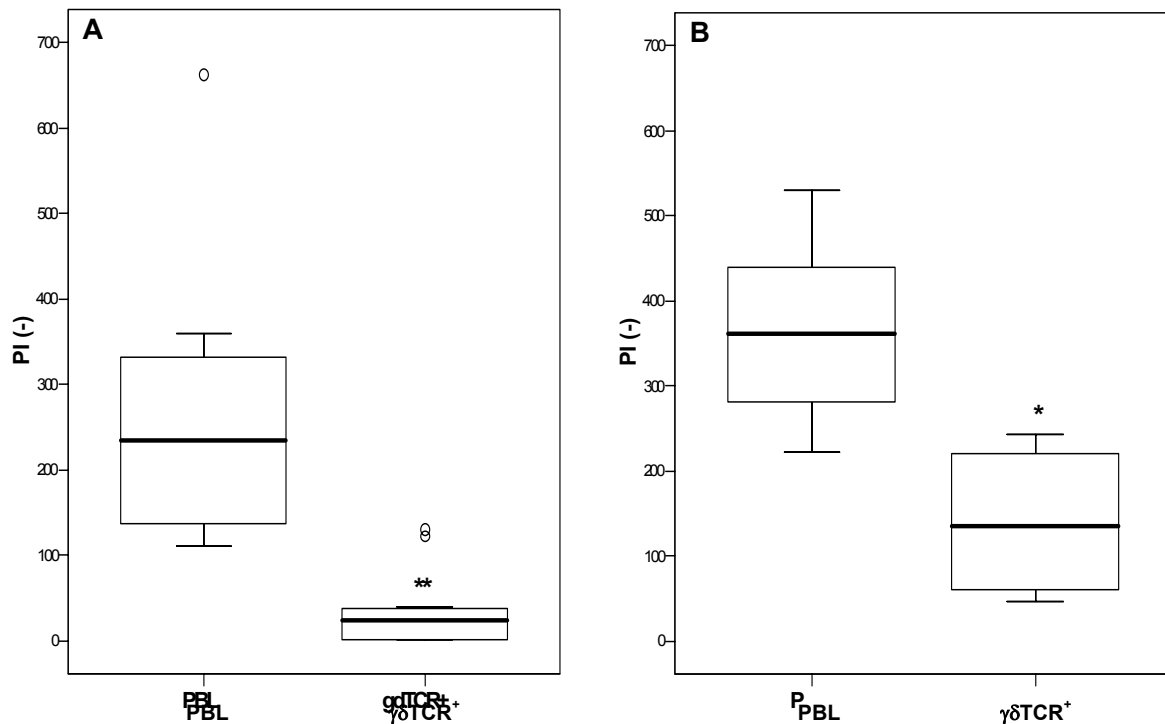


Abb. 32: $\gamma\delta$ T-Zellen sind anerg. Proliferationsindices PI (-) stimulierter PBL und $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺) infolge (A) anti-CD3/CD28-Stimulation und (B) Stimulation via anti-CD3/CD28 + rIL-2 (O: Ausreisser); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ im Vergleich zu PBL.

Neben ihrer anergen Eigenschaft supprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen die Proliferation anderer Zellen. So zeigten humane CD4⁺ T-Zellen nach allogener Cokultivierung mit $\gamma\delta$ T-Zellen eine deutlich geringere Proliferation als in der Monokultur. Die Cokultivierung erfolgte in verschiedenen Zellverhältnissen (1:1, 1:0,5 und 1:0,25), und der supprimierende Effekt der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte sich schon bei so geringen Zellverhältnissen wie 1:0,25 (Abb. 33).

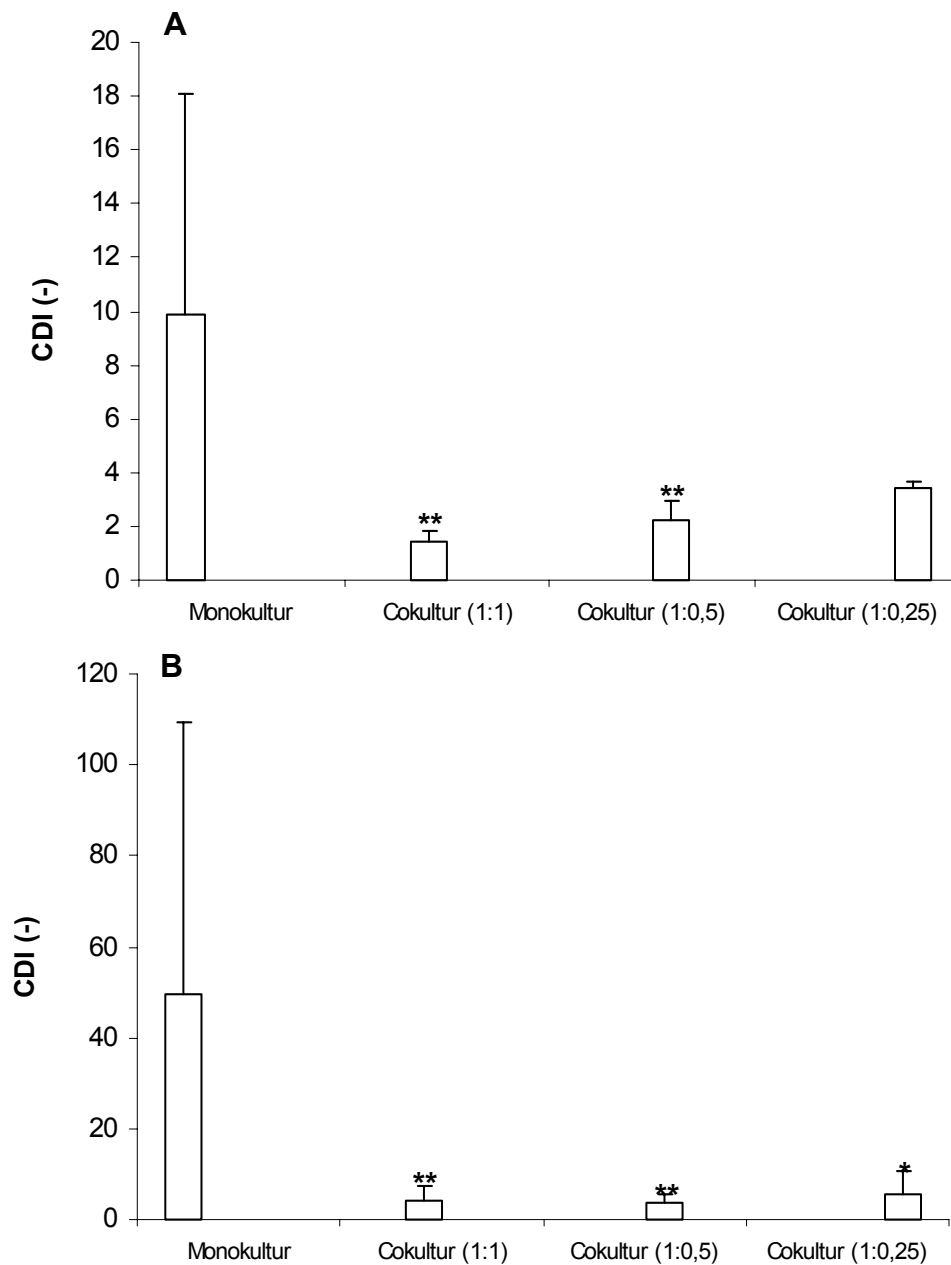


Abb. 33: **Wachstumshemmung humaner CD4⁺ T-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen.** Zellteilungsindices CDI (-) von CD4⁺ T-Zellen infolge (A) anti-CD3/CD28-Stimulation und (B) Stimulation via anti-CD3/CD28 + rIL-2 in der Mono- und allogenen Cokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen in verschiedenen Zellverhältnissen (MW + STABW); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ im Vergleich zur Monokultur.

Hinsichtlich des Zytokinprofils fanden sich im Kulturüberstand stimulierter (anti-CD3/CD28) $\gamma\delta$ T-Zellen nach 48h vernachlässigbar geringe Mengen an IL-2, jedoch erhöhte Konzentrationen an IL-10, TGF- β und IFN- γ (Abb. 34).

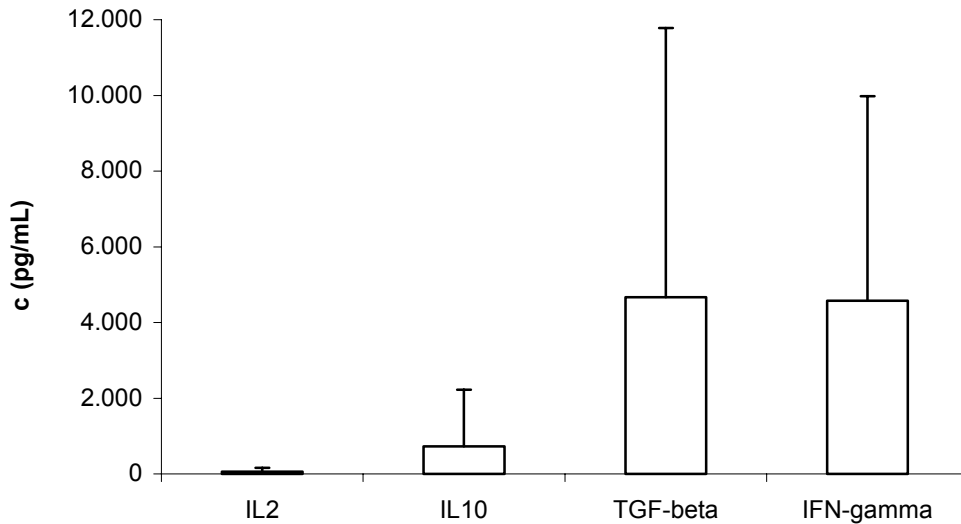


Abb. 34: $\gamma\delta$ T-Zellen produzieren kaum IL-2, jedoch große Mengen an IL-10, TGF- β und IFN- γ . Zytokinkonzentration c (pg/mL) im Kulturüberstand anti-CD3/CD28-stimulierter $\gamma\delta$ T-Zellen (MW + STABW).

Betrachtet man die intrazellulären Zytokine bestätigt sich dieser Trend. Nur ein geringer Prozentsatz der $\gamma\delta$ T-Zellen produzierte IL-2, während ungefähr die Hälfte der Zellen IFN- γ bildete. Allerdings produzierten nur etwa 20% der $\gamma\delta$ T-Zellen die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 (Abb. 35).

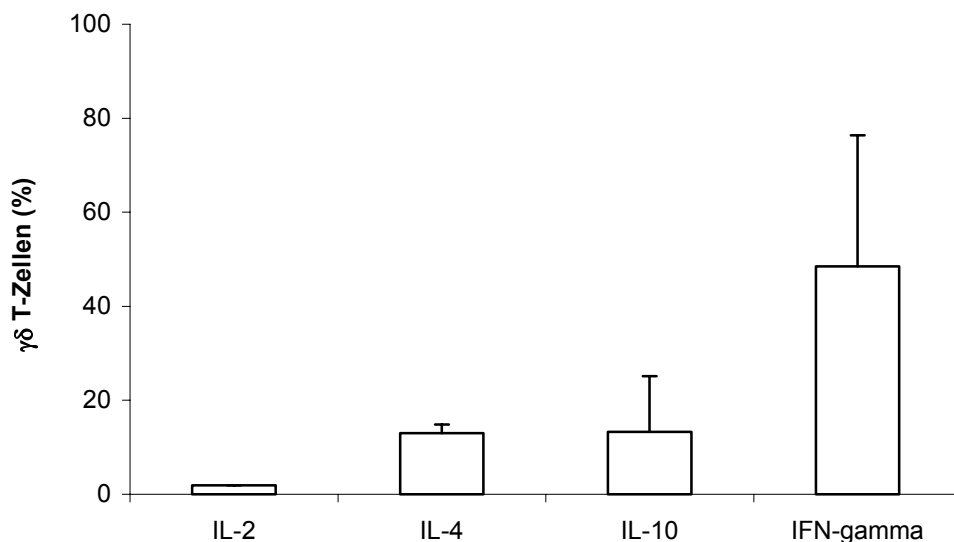


Abb. 35: Nur wenige $\gamma\delta$ T-Zellen produzierten IL-2, die meisten produzierten IFN- γ und etwa ein Viertel IL-4 und IL-10. Durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Zytokine von $\gamma\delta$ T-Zellen (MW + STABW, %).

Vergleicht man nun die Zytokinsekretion der $\gamma\delta$ T-Zellen mit der von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, zeigt sich zwar eine vergleichbare Sekretion an IL-2, IL-10 und IFN- γ , jedoch eine erhöhte Sekretion von TGF- β . Stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen sezernierten im Mittel (\pm STABW) 4.674 ± 432 pg/mL TGF- β im Vergleich zur TGF- β -Sekretion von 2.764 ± 1.581 pg/mL von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen ($P < 0,01$). Im Vergleich zu PBL sezernierten $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich weniger IL-2 (55 ± 102 pg/mL vs. 734 ± 1.003 pg/mL, $P < 0,05$) und auch geringere Mengen an IFN- γ ($4,5 \pm 5,1$ ng/mL vs. $19,4 \pm 14,0$ ng/mL, $P < 0,01$). Hinsichtlich ihrer anergen Eigenschaften sind $\gamma\delta$ T-Zellen mit $CD4^+CD25^+$ T-Zellen vergleichbar, d.h. es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferationsindices. Dies trifft jedoch nicht auf ihre supprimierenden Eigenschaften zu. In der un- und costimulierten Cokultur zeigen sich zwar bei einem Zellverhältnis von 1:1 keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Wachstumshemmung von $CD4^+$ T-Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, aber in der costimulierten Cokultur nach Zugabe von rIL-2 zeigen $\gamma\delta$ T-Zellen einen Trend zu erhöhter Suppression ($53 \pm 95\%$ Suppression vs. $40 \pm 18\%$ Suppression, $P = 0,068$). Dieser Trend manifestiert sich in einer statistisch signifikanten Suppression bei einem Cokultiverungsverhältnis von 1:0,5 ($83 \pm 17\%$ Suppression vs. $28 \pm 8\%$ Suppression, $P < 0,01$).

4.7.2 Anreicherung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro*

Für die Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro* aus humanen PBL wurden zuerst verschiedene Stimulationen getestet, um eine hohe Ausbeute an $\gamma\delta$ T-Zellen zu erzielen. Die Zellsuspensionen wurden regelmäßig gesplittet und Proben für durchflusszytometrische Untersuchungen und Zytokinmessungen entnommen. Es wurde die nicht-peptidische Substanz Isopentenylpyrophosphat (IPP) in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von rIL-2 getestet. Die Zugabe von rIL-2 stellte sich für die Kultivierung als unbedingt erforderlich heraus, da sonst innerhalb einer Woche sämtliche Zellen abstarben. Im IPP-Stimulationsansatz zeigte sich eine erfolgreiche Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen bei einer Konzentration von $5 \mu\text{g/mL}$ IPP + 50 U/mL rIL-2. Ebenfalls zeigten lange Kultivierungsintervalle einen positiven Einfluss auf die Anreicherung, d.h. ein Splitting alle 5-7 Tage (Abb. 36).

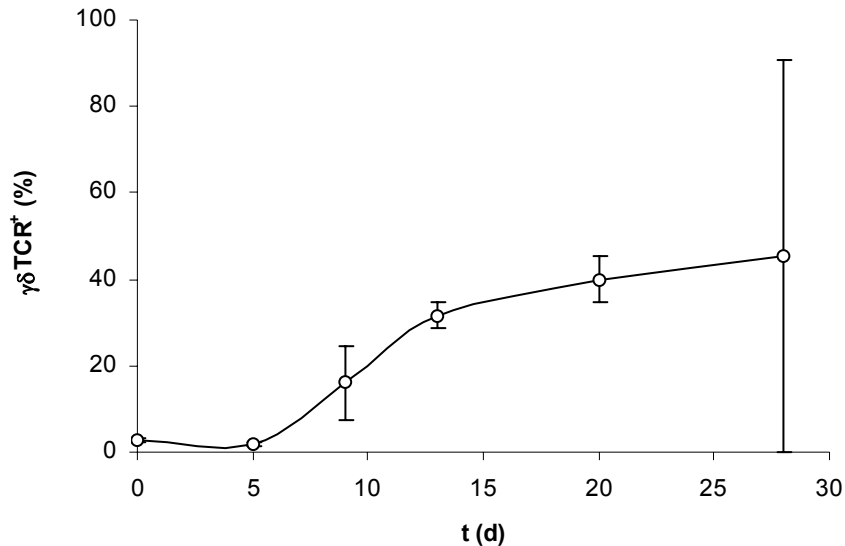


Abb. 36: Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen aus humanen PBL durch Stimulation mit IPP + rIL-2. Zeitlicher Verlauf der $\gamma\delta$ T-Zellanreicherung (MW \pm STABW, %) aus humanen PBL durch Stimulation mit 5 μ g/mL IPP + 50 U/mL rIL-2.

Der große Fehlerbalken an Tag 28 weist auf ein großes Absterben der $\gamma\delta$ T-Zellen in dieser Kultur hin; in 2 von 4 Fällen zeigte sich eine rapide Abnahme der $\gamma\delta$ T-Zellen zu diesem Zeitpunkt. Vermutlich reicht ein „Überwachsen“ der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Kultur und ein regelmäßiges Splitting nicht aus, um negative Effekte toter Zellen auf die Kultur zu limitieren. Anhand des Zytokinprofils ließ sich allerdings keine Aussage über die Anreicherung treffen. So standen weder IL-10 und TGF- β (Abb. 37A) noch IFN- γ (Abb. 37B) in Relation zur Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen.

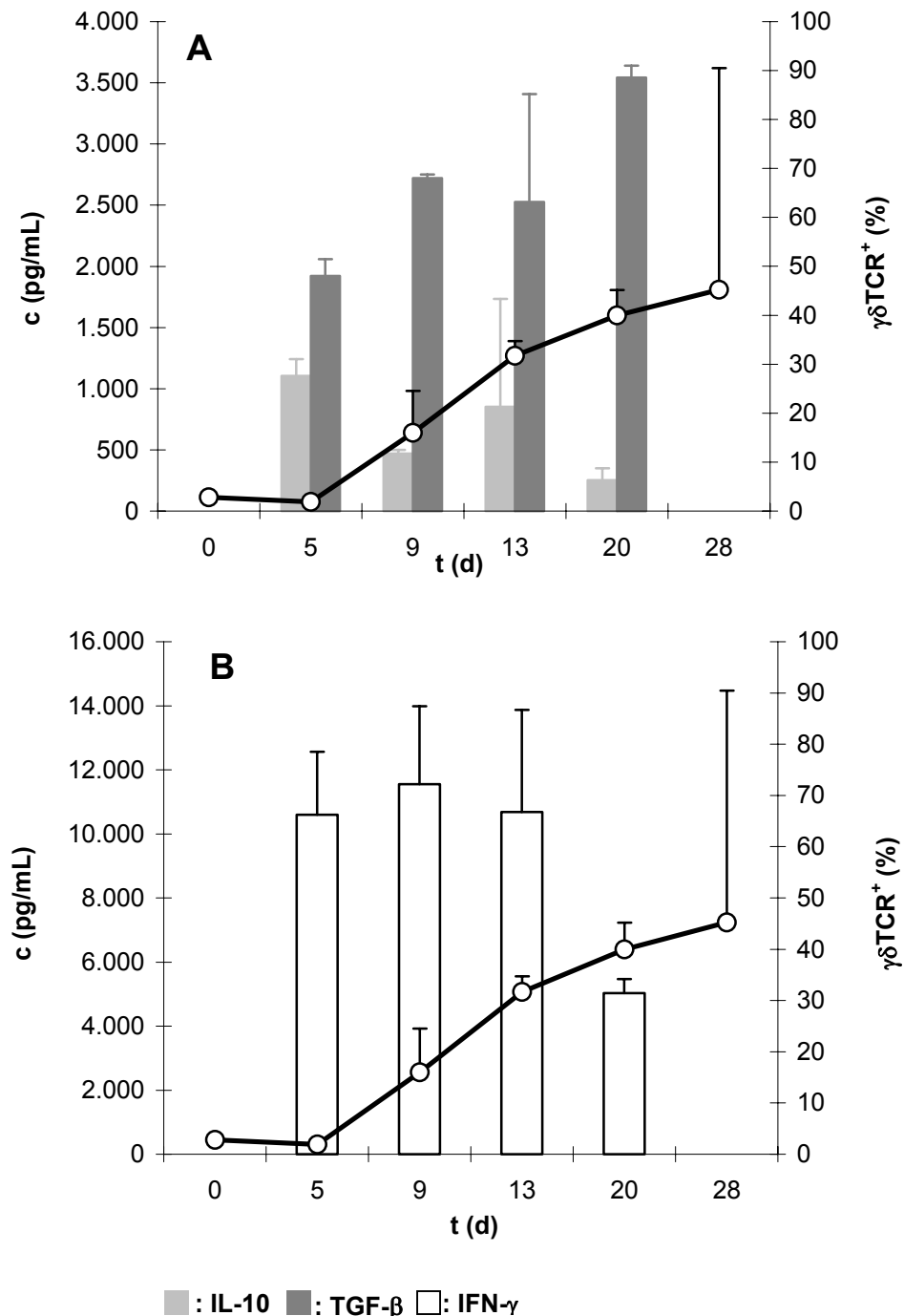


Abb. 37: Zwischen der $\gamma\delta$ T-Zellanreicherung und den sezernierten Zytokinen zeigte sich **keine Relation**. Zeitlicher Verlauf der $\gamma\delta$ T-Zellanreicherung (—○—: $\gamma\delta$ TCR⁺, %) aus humanen PBL durch Stimulation mit 5 μ g/mL IPP + 50 U/mL rIL-2 und der Konzentration c (pg/mL) der Zytokine (A) IL-10 und TGF- β und (B) IFN- γ .

Die Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen aus humanen PBL durch Stimulation mit Alendronat (Natriumalendronat, Fosamax[®]) zeigte sich weniger erfolgreich. Im Stimulationsansatz mit Alendronat (1-10 μ M) und rIL-2 (50-200 U/mL) wurden hauptsächlich CD4⁺CD25⁺ T-Zellen angereichert. Nach dreiwöchiger Stimulation

(1 µg/mL Alendronat + 100 U/mL rIL-2) wurde der Anteil der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Kultur um den Faktor 7,9 (von 5,3 ± 0,8% auf 41,8 ± 4,0%) gesteigert, während die γδ T-Zellen lediglich um den Faktor 4,9 (von 3,1 ± 0,6% auf 15,2 ± 1,8%) angereichert wurden. Am erfolgreichsten für die Anreicherung der γδ T-Zellen erwies sich die Alendronat-Stimulation unter Th2-„priming“ Bedingungen, während unter Th1-„priming“ Bedingungen keine γδ T-Zellen generiert werden konnten (Abb. 38). Allerdings zeigte sich unter Th2-„priming“ Bedingungen gleichzeitig eine Anreicherung der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (von 5,1 ± 0,9% auf 24,4 ± 4,2%), die jedoch im Vergleich zu der γδ T-Zellanreicherung vergleichsweise gering ausfiel. Allerdings war ab Tag 28 ein starker Abfall in der Zellzahl sowohl der γδ T-Zellen als auch der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zu verzeichnen; vermutlich war auch in diesem Stimulationsansatz ein Splitting der Kultur nicht ausreichend, um tote Zellen zu verdünnen. Ein Abtrennen dieser toten Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation nach 21 Tagen hätte vermutlich einen positiven Einfluss auf die Kultur gezeigt.

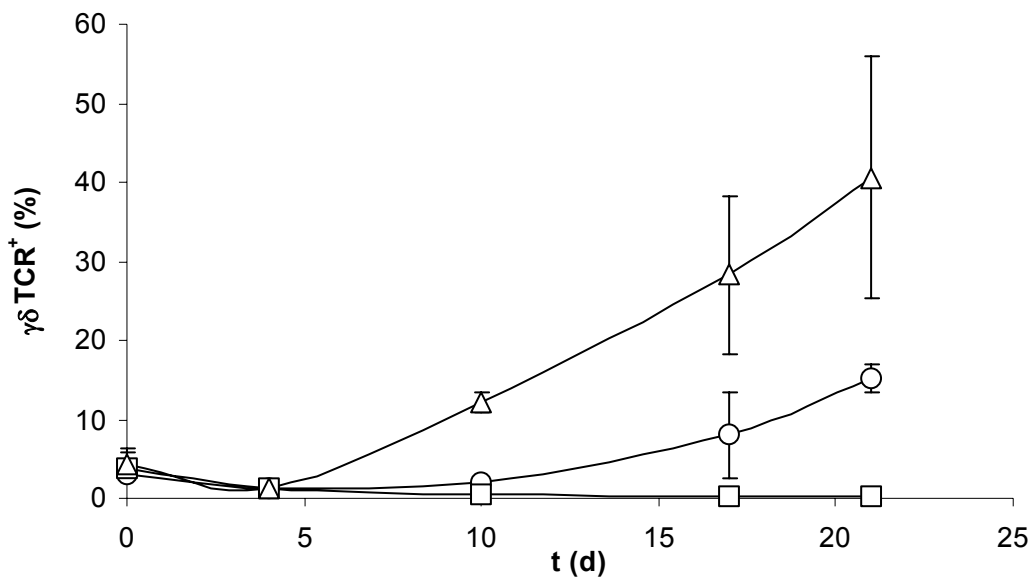


Abb. 38: Anreicherung von γδ T-Zellen aus humanen PBL durch verschiedene Alendronat-Stimulationen. Zeitlicher Verlauf der γδ T-Zellanreicherung (MW ± STABW, %) aus humanen PBL durch Stimulation mit 1µg/mL Alendronat und 100 U/mL rIL-2 (—○—) sowie unter Th1-„priming“ (—□—) und Th2-„priming“ (—△—) Bedingungen.

Allerdings zeigte sich auch hier kein Zusammenhang zwischen der Anreicherung der $\gamma\delta$ T-Zellen und der Konzentration der sezernierten Zytokine (IL-10, TGF- β und IFN- γ) im Kulturüberstand (Abb. 39).

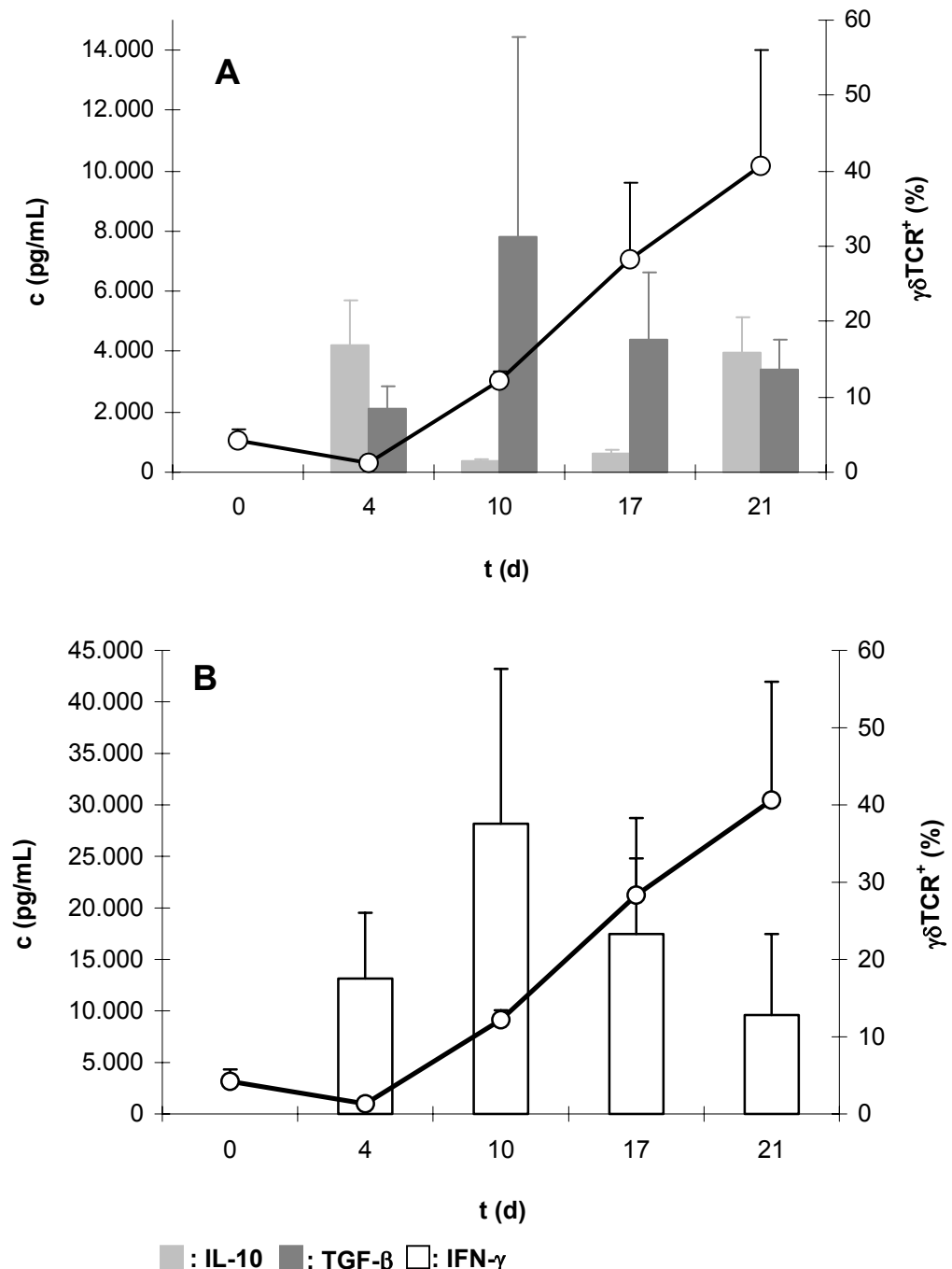


Abb. 39: Es bestand keine Relation zwischen $\gamma\delta$ T-Zellanreicherung und der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand. Zeitlicher Verlauf der $\gamma\delta$ T-Zellanreicherung (—○—: $\gamma\delta$ TCR⁺, %) aus humanen PBL durch Alendronat-Stimulation (1 μ g/mL Alendronat + 100 U/mL rIL-2) unter Th2-„priming“ Bedingungen (+ 10 ng/mL rIL-4 + 5 μ g/mL anti-IL12) und der Zytokinkonzentration c (pg/mL) von (A) IL-10 und TGF- β sowie (B) IFN- γ .