

## 5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beteiligung von  $\gamma\delta$  T-Zellen an der Entstehung und dem Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) unter Verwendung verschiedener Tiermodelle sowie ihr funktionelles Repertoire *in vitro* untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf einen regulatorischen, protektiven Einfluss der  $\gamma\delta$  T-Zellen auf das Entzündungsgeschehen bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) hin, den sie vermutlich über die Regulation der Zytokindisbalance und über ihre Beteiligung an der epithelialen Regeneration sowie durch Suppression unkontrolliert aktivierter und proliferierender Entzündungszellen vermitteln.

Das Fehlen von  $\gamma\delta$  T-Zellen, sei es aufgrund genetischer Defizienz oder infolge Depletion *in vivo*, resultierte in den untersuchten CED-Tiermodellen in einer Exazerbation der Entzündung. Wohingegen der Transfer von  $\gamma\delta$  T-Zellen im induzierbaren Mausmodell zu einer Verbesserung der Colitis führte.

Die Ergebnisse aus den Tiermodellen, die durch *in vitro*-Untersuchungen gestützt werden, zeigen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen für eine Immuntherapie bei CED-Patienten eventuell in Frage kommen. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Generierungsmethoden zur Anreicherung humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen aus Vollblut getestet, von denen zwei Stimulationsansätze hohe Ausbeuten lieferten, die jedoch noch validiert und optimiert werden müssen.

### 5.1 Defizienz/Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen verschlimmert CED

Im Mausmodell der DSS-induzierten Colitis führte die Depletion von  $\gamma\delta$  T-Zellen zu einer histologischen Verschlimmerung der Colitis sowie zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-6 durch LPL. Die erhöhte Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-6 ist mit der Schädigung des mukosalen Epithels assoziiert. So schaden hohe Konzentrationen an IFN- $\gamma$  dem Epithel sowohl direkt als auch indirekt. Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  ist an der intestinalen Entzündung bei CED beteiligt und führt durch die Schädigung der „tight junctions“ zu einer Steigerung der mukosalen Permeabilität<sup>131-133</sup>. So erfolgt einerseits eine direkte Epithelschädigung durch IFN- $\gamma$ , andererseits indirekt, da IFN- $\gamma$  an der Rekrutierung und Aktivierung von

Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) beteiligt ist, denn diese Zellen vermitteln durch die Sekretion reaktiver Metaboliten eine sekundäre Gewebeschädigung<sup>134, 135</sup>. Das Zytokin IL-6 vermittelt Epithelschädigungen durch Störung der Integrität des intestinalen Epithels<sup>136</sup>, Induktion anti-apoptotischer Gene und Beeinflussung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf vaskulärem Endothel<sup>137-139</sup>. Eine erhöhte IL-6-Sekretion ist für CED beschrieben<sup>140-142</sup>. Im Tiermodell erwies sich die Behandlung mit anti-IL-6 mAk als effektive Therapie; es konnte die Colitisaktivität vermutlich über die Induktion der T-Zellapoptose unterdrückt werden<sup>5, 142</sup>. Auch in klinischen Studien zeigte sich eine anti-IL-6 Behandlung effektiv in der Therapie von MC<sup>143</sup>. Dass die Aggravation der DSS-induzierten Colitis tatsächlich durch die  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion zu erklären ist, legen die Experimente mit  $\gamma\delta$  T-Zell defizienten Mäusen nahe. So zeigten  $\gamma\delta$ TCR ko Mäuse mit DSS-induzierter Colitis ebenfalls eine schwerwiegende Schädigung der intestinalen Mukosa, die gleichfalls mit einer erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$  durch LPL sowie einer erniedrigten Sekretion des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  assoziiert war. Ferner sezernierten mLKL und Splenozyten der  $\gamma\delta$ TCR ko Tiere vermehrt IFN- $\gamma$  und vermindert IL-10. Neben der erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$  sezernierten LPL vermehrt IL-2 und TNF- $\alpha$  sowie IL-10. Diese erhöhte Sekretion von IL-10 durch LPL scheint im Widerspruch zu dem vorherrschenden Zytokinprofil (erhöhte Sekretion von Th1- und erniedrigte Sekretion von Th2-Zytokinen) zu stehen, ist jedoch ein typisches Merkmal der DSS-induzierten Colitis<sup>99, 144</sup> und tritt auch bei CU auf<sup>145</sup>. Die ausgeprägte epitheliale Schädigung und das Zytokinprofil weisen auf eine verminderte Wundheilung infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion/defizienz hin. So ist TGF- $\beta$ , das infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldefizienz vermindert ist, wichtig für die Aufrechterhaltung der mukosalen Integrität und für die intestinale immunologische Balance<sup>146-149</sup>. An der Wundheilung ist TGF- $\beta$  durch Förderung der Epithelzell-Restitution beteiligt<sup>150, 151</sup>. Dies bestätigte sich auch im Tiermodell, wo aufgrund einer TGF- $\beta$ -Defizienz eine erhöhte CED-Empfänglichkeit und verminderte Wundheilung zu beobachten ist<sup>146, 152</sup>. Im vorliegenden Versuch scheint die Epithelschädigung einerseits aus verminderter Wundheilung aufgrund erniedrigter TGF- $\beta$ -Sekretion zu resultieren, andererseits durch die erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine hervorgerufen worden zu sein. Neben IFN- $\gamma$  ist auch das Th1-Zytokin TNF- $\alpha$  durch seine chemotaktischen Eigenschaften an der Rekrutierung von Makrophagen und

Neutrophilen beteiligt, so dass die erhöhte Sekretion von TNF- $\alpha$  durch LPL  $\gamma\delta$  T-Zell defizienter Tiere vermutlich ebenfalls zur Epithelschädigung beiträgt. Eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Sekretion ist ein CED-typisches Merkmal<sup>153-155</sup> und wirkt sich negativ auf die Wundheilung aus<sup>156</sup>. So konnte im Tiermodell der TNF-Rezeptor p55 ko Maus eine verlangsamte Wundheilung gezeigt werden<sup>157</sup>. TNF- $\alpha$  führt vermutlich zu verminderter Angiogenese und Collagenakkumulation sowie zur Herunterregulierung des protektiven intestinalen Trefoil Faktors<sup>158</sup>, der die Kolonmukosa schützt und an der epithelialen Regeneration beteiligt ist<sup>159, 160</sup>. Desgleichen stellte sich eine anti-TNF- $\alpha$ -gerichtete Therapie sowohl im Tiermodell<sup>128, 161</sup> als auch beim Menschen (Infliximab; in Deutschland seit 1999 zugelassen) als wirksam heraus. Makrophagen und Neutrophile wirken jedoch nicht nur destruktiv, sondern durchaus auch protektiv. So fördern sie zwar einerseits die Entzündung bei CED<sup>162-164</sup>, andererseits sind sie an der Wundheilung beteiligt und vermeiden Wundinfektionen<sup>165-168</sup>. Diese protektive Rolle der Neutrophilen wird auch durch Ergebnisse aus eigenen Versuche gestützt. So führte die Depletion der Neutrophilen bei Ratten mit DNBS-induzierter Colitis zu einer fulminanten Colitis sowie zu extraintestinalen Manifestationen (Kuehl et al., unpubliziert). Neutrophile und Makrophagen sind zwar an der Wundheilung beteiligt, eine unkontrollierte Aktivierung dieser Zellen kann jedoch auch zu einer Gewebeschädigung führen; zur Vermeidung einer exzessiven Gewebeschädigung, sollte die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und Neutrophilen kontrolliert ablaufen. Hierbei spielen wiederum regulatorische  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Rolle, da sie die Homöostase dieser Zellen aufrecht erhalten und aktivierte Phagozyten abtöten<sup>69, 75</sup>. Somit sind  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht nur über die Sekretion antiinflammatorische Zytokine, sondern auch über die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase an der Protektion des Epithels beteiligt. Die exzessive Gewebeschädigung infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldefizienz/depletion könnte somit zu einer exzessiven inflammatorischen Reaktion des Organismus führen. Die Folge wäre eine Disregulation inflammatorischer Lymphozyten mit Th1-Dominanz, wodurch Th1-Zytokine, die zur Wundheilung beitragen sollen, beispielsweise IL-2, vermehrt ausgeschüttet werden. IL-2 fördert die Induktion der TGF- $\beta$ -Expression und somit die Epithelzell-Restitution<sup>148, 169</sup> und stellt somit einen Kompensationsversuch dar. Die Restitution erfolgt jedoch nur bei leichten Verletzungen oberhalb der Lamina propria, ernsthaftere Verletzungen bis tief in die Lamina propria erfordern eine komplexe

Regeneration unter Beteiligung verschiedener Zytokine und Immunzellen<sup>151</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion/defizienz wirkt sich somit in zweifacher Hinsicht negativ auf den Verlauf der DSS-induzierten Colitis aus: zum einen zeigen die depletierten/defizienten Tiere eine erhöhte Colitis-Empfänglichkeit und zum anderen kommt es zu einer Überreaktion der Entzündungsantwort. D.h. es fehlen regulatorische  $\gamma\delta$  T-Zellen, die die Immunantwort der Entzündungszellen regulieren und somit eine „Flut“ proinflammatorischer Zytokine verhindern. Dass sich die Effekte in  $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen deutlicher zeigen als in  $\gamma\delta$  T-Zell depletierten Tieren, mag darin begründet sein, dass eine Zelldepletion i.d.R. weniger stringent ist als eine Defizienz. Die erhöhte Empfänglichkeit von  $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen für DSS-induzierte Colitis wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben<sup>62, 83, 84</sup>, die ebenfalls eine verminderte Wundheilung, Barrierestörungen und aktivierte Makrophagen ursächlich dafür halten.

Die Ergebnisse aus dem DSS-induzierten Colitis-Modell konnten in immunologischen Modellen bestätigt werden. Auch im Colitis-Modell der IL-2 ko Maus zeigte sich infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion eine erhöhte Sekretion von Th1- und eine erniedrigte Sekretion von Th2-Zytokinen. Die Depletion von  $\gamma\delta$  T-Zellen vor Colitisentwicklung (Frühdepletion) oder bei etablierter Colitis (Spätdepletion) resultierte in erhöhter IFN- $\gamma$ -Sekretion und erniedrigter IL-10-Sekretion (infolge Spätdepletion) durch LPL. So kam es vermutlich auch in diesem Modell durch die erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegel zu einer direkten und indirekten Epithelschädigung. Die erniedrigte IL-10-Sekretion wiederum resultiert in verminderter Wundheilung und Immunsuppression<sup>170, 171</sup>. Die erniedrigte Sekretion von IL-10 zeigte sich ebenfalls in lymphatischem Gewebe, da auch Splenozyten sowohl infolge Früh- als auch Spätdepletion vermindert IL-10 sezernierten. Da IL-10 die Immunantworten von T-Zellen und Makrophagen sowie die Produktion von Th1-Zytokinen herunterreguliert<sup>3</sup>, könnten die verminderten IL-10-Spiegel für die erhöhte Sekretion von IFN- $\gamma$  und die anhaltende Entzündungsantwort in IL-2 ko Mäusen verantwortlich sein. Überdies ist IL-10 für die Expansion TGF- $\beta$ -produzierender regulatorischer T-Zellen wichtig<sup>172</sup>, d.h. eine verminderte IL-10-Produktion hätte eine verminderte Ausbreitung von regulatorischen, sprich supprimierenden, T-Zellen und somit eine verminderte TGF- $\beta$ -Produktion zur Folge. Auch dies würde zur Chronizität der Entzündung

beitragen. Im vorliegenden Fall zeigte sich zwar kein Einfluss der  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion auf die Sekretion von TGF- $\beta$ , andererseits sezernierten sowohl mLKL als auch Splenozyten und LPL von IL-2 ko Mäusen sehr geringe Mengen an TGF- $\beta$  (durchschnittlich 167 pg/mL). Diese geringe TGF- $\beta$ -Produktion ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in IL-2 ko Mäusen nicht vorkommen<sup>14</sup>. Da Waidmann et al. jedoch IL-10-produzierende regulatorische T-Zellen im intestinalen Gewebe von IL-2 ko Mäusen identifizierten<sup>122</sup>, könnte es sich bei dieser Population um regulatorische  $\gamma\delta$  T-Zellen handeln. Dies würde dann auch die verminderte IL-10-Sekretion infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion erklären. Im Gegensatz hierzu scheint eine Überexpression von IL-10 ein CU-typisches Merkmal zu sein<sup>145, 173</sup>, was wiederum mit der schlechten Wirksamkeit einer rIL-10-Behandlung bei CU<sup>174</sup> und MC<sup>175</sup> in Einklang stehen würde. Andererseits darf man an das Zytokinmilieu in Tieren mit einer Zytokindefizienz vermutlich nicht die gleichen Ansprüche stellen wie an Wildtypen oder das humane System. So mag es zutreffen, dass unter „normalen“ Bedingungen kolonische T-Zellen vermehrt IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase produzieren und bei CU eine IL-10-Überproduktion zu beobachten ist<sup>145</sup>, auf IL-2 ko Mäuse mag dies jedoch nicht anwendbar sein (Kompensation durch Redundanz). Neben der Zytokindisbalance ist im Falle der IL-2 ko Maus die erhöhte Mortalität infolge Frühdepletion der  $\gamma\delta$  T-Zellen auffällig, obwohl die Tiere nur eine mäßige epitheliale Schädigung aufwiesen. Dies steht im Gegensatz zu früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe, die bei TNBS-induzierter Colitis in Ratten infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion eine erhöhte Mortalität mit schweren Epithelschäden assoziiert fand<sup>86</sup>. Infolge Spätdepletion war die epitheliale Schädigung bei IL-2 ko Mäusen ebenfalls nur mäßig, ein Einfluss auf die Mortalität zeigte sich jedoch nicht. Desgleichen zeigte die Früh-, aber nicht die Spätdepletion, einen Einfluss auf die Kolonlänge. Besonders auffällig war ferner die ausgeprägte Splenomegalie infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion. Obwohl Splenomegalie ein typisches Merkmal der IL-2 ko Maus ist<sup>111</sup>, war diese in  $\gamma\delta$  T-Zelldepletierten Mäusen extrem ausgeprägt. Dies lässt vermuten, dass die erhöhte Mortalität der Tiere nicht auf eine schwerwiegende Colitis, sondern auf die Splenomegalie zurückzuführen ist. Gegen diese Hypothese spricht, dass vergrößerte Milzen nicht nur infolge Frühdepletion, sondern auch bei Spätdepletion auftraten. Da die vergrößerten Milzen im Falle der Frühdepletion nicht mit einer erhöhten

Proliferation der Splenozyten einhergehen, im Blutbild jedoch eine Abnahme der Leukozyten zu beobachten ist, kann es zu einer verstärkten Migration und Homing der Leukozyten in die Milz gekommen sein. Verwunderlich ist nur, dass beides nicht für die Spätdepletion zutrifft, d.h. weder ein Einfluss der  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion auf die Proliferation der Splenozyten noch auf die Leukozytenzahl. Indes ist zu bemerken, dass infolge hämolytischer Anämie, ebenfalls ein typisches Merkmal von IL-2 ko Mäusen<sup>111</sup>, eine Blutabnahme nicht immer erfolgreich war. Weitere Untersuchungen bezüglich der Splenomegalie und des Blutbildes mit höheren Fallzahlen könnten in diesem Punkt Aufschluss geben. Weiterführende Untersuchungen könnten dann auch den Umstand der bakteriellen Translokation zum Inhalt haben. Klinisch spielt die bakterielle Translokation eine Rolle bei Organversagen und Sepsis, und sie wird im Zusammenhang mit CED diskutiert<sup>176, 177</sup>. Wäre die erhöhte Mortalität auf bakterielle Translokation aufgrund einer zerstörten epithelialen Barriere zurückzuführen, würde dieser Umstand für ein verringertes Überleben infolge ernsthafter Colitis und Aggravation durch die Depletion der  $\gamma\delta$  T-Zellen sprechen. Übereinstimmend mit dieser Hypothese stehen Ergebnisse von Fiorucci et al., die im Mausmodell der TNBS-induzierten Colitis verlängertes Überleben und verminderte Entzündungsschwere durch Antibiotikabehandlung, die die bakterielle Translokation verhinderte, erzielten<sup>176</sup>. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  die „tight junctions“ aufbricht und somit zur Zerstörung der epithelialen Barriere führt („leaky gut“), wodurch Enterobakterien vom Darm in den Körper entweichen können<sup>178</sup>. Dies wiederum deckt sich mit der erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretion durch LPL infolge Früh- und Spätdepletion. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass die Depletion der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Colitisentstehung einen gravierenderen Einfluss auf den Entzündungsverlauf hat als die Depletion bei etablierter Colitis. Im Umkehrschluss heisst das, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem im frühen Entzündungsgeschehen eine Rolle spielen. Abschließend ist anzumerken, dass die durchflusszytometrische Überprüfung der  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion zwar nur eine 85%ige Reduktion der  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> Splenozyten zeigte, dass jedoch von einer erfolgreichen Depletion während des Versuches ausgegangen werden kann, da der depletierende mAk bis zur 12. Lebenswoche appliziert wurde, die Tiere jedoch erst in der 14. Lebenswoche getötet wurden. D.h. innerhalb dieser 14 Tage hat sich vermutlich ein Teil der  $\gamma\delta$  T-Zellpopulation rekonstituiert. Dies wird durch die Daten unterstrichen, in

denen eine 97%ige Depletion (2 Tage nach der letzten Antikörpergabe) gefunden wurde.

Die Exazerbation der intestinalen Entzündung infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion im immunologischen Colitis-Modell konnte auch im immunologischen Crohn-Modell bestätigt werden. Wie bei den IL-2 ko Mäusen zeigte die durchflusszytometrische Überprüfung der  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion eine 85%ige Reduktion der  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> Splenozyten, was auch in diesem Fall daran liegen könnte, dass die  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion bis zur 12. Lebenswoche der Tier durchgeführt wurde, die Tötung allerdings erst in der 14. Lebenswoche erfolgte. Im vorliegenden Versuch wurden heterozygote TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse verwendet, da homozygote Tiere aufgrund ihrer Multimorbidität i.d.R. nicht älter als 6 Wochen wurden. Im Modell der heterozygoten TNF<sup>ΔARE</sup> Maus, die eine intestinale Entzündung mit Morbus Crohn-Phänotyp entwickelt, resultierte die  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion in einer massiven terminalen Ileitis mit diskontinuierlicher, transmuraler Entzündung und hohem Infiltrationslevel. Die fokale transmurale Entzündung ist ein typisches histologisches Merkmal des Morbus Crohn<sup>179</sup>. Auffallend war auch in diesem Modell die Zytokinbalance (erhöhte Sekretion von Th1- und erniedrigte Sekretion von Th2-Zytokinen) infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion. LPL aus dem Ileum  $\gamma\delta$  T-Zell depletierter TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse sezernierten vermehrt IFN- $\gamma$  und vermindert IL-10 und TGF- $\beta$ . D.h. auch in diesem Fall ist die ausgeprägtere intestinale Schädigung vermutlich auf dieses Zytokinprofil zurückzuführen. Wie eingangs beschrieben, führen erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel zur direkten und indirekten Epithelschädigung und erniedrigte IL-10- und TGF- $\beta$ -Spiegel zu verminderter Wundheilung und verminderter Immunsuppression. Dieses Zytokinprofil zeigte sich auch in lymphatischen Geweben, so sezernierten mLKL und Splenozyten  $\gamma\delta$  T-Zell depletierter Tiere vermehrt IFN- $\gamma$  und vermindert TGF- $\beta$  im Vergleich zu Kontrolltieren. Gleichzeitig zeigten mLKL  $\gamma\delta$  T-Zell depletierter TNF<sup>ΔARE</sup> Mäuse eine erhöhte Sekretion von IL-10. Diese erhöhte IL-10-Sekretion zeigte sich auch in einem anderen MC-Modell, dem der SAMP1/Yit Maus, mit einer Korrelation zwischen der Schwere der Ileitis und ansteigender IL-10-Konzentration<sup>180</sup>. Vermutlich ist eine Fehlregulierung des IFN- $\gamma$ -Signalweges für die immunologischen Abnormalitäten in diesem Modell verantwortlich<sup>180</sup>. Obwohl IL-10 Th1-Zytokine und somit auch IFN- $\gamma$  herunterreguliert, könnte dieser Schluss durchaus zutreffen, da sich in der IL-10 tg

Maus, die eine IL-10-Überexpression aufweist, eine ausreichende IFN- $\gamma$ -Synthese für eine potente Immunantwort<sup>181</sup> zeigt.

Der Umstand des gestörten IFN- $\gamma$ -Signalweges sollte abschließend näher untersucht werden, da sich auch in allen anderen Modellen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (DSS-induzierte Colitis, immunologisches Colitis-Modell und immunologisches Crohn-Modell) infolge  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion/defizienz eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Sekretion bei erniedrigter Sekretion antiinflammatorischer Zytokine zeigte. Die mögliche Beteiligung der  $\gamma\delta$  T-Zellen an der Regulation der IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde in einem induzierbaren Modell in IFN- $\gamma$  ko Mäusen untersucht. IFN- $\gamma$  ko Mäuse besitzen ein scheinbar normales Immunsystem, jedoch eine defekte Resistenz gegenüber Infektionen<sup>182, 183</sup>. Da IFN- $\gamma$ -Rezeptor ko Mäuse empfänglich für chemisch-induzierte Colitis sind<sup>184</sup> und der Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus IFN- $\gamma$  ko Mäusen zur Colitisentwicklung in SCID Mäusen führte<sup>185</sup>, sind erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel zwar ein Merkmal der CED, dieses Zytokin jedoch nicht essentiell für die Entstehung einer intestinalen Entzündung. So wurde im vorliegenden Versuch der Einfluss einer  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion auf die DSS-induzierter Colitis in IFN- $\gamma$  ko Mäusen untersucht und sollte keinen signifikanten Einfluss auf den Colitisverlauf zeigen. Dabei zeigte die  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion in IFN- $\gamma$  ko Mäusen keinen schwereren Verlauf der DSS-induzierten Colitis. Die  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion hatte keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf, die Überlebensrate, den makroskopischen sowie histologischen Score, die Kolonlänge, das Blutbild oder die Zytokinsekretion. Mit anderen Worten,  $\gamma\delta$  T-Zellen scheinen das Entzündungsgeschehen bei CED über die Regulierung des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  zu beeinflussen. Da vermutlich  $\alpha\beta$  T-Zellen dieses IFN- $\gamma$  sezernieren, muss man annehmen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen die IFN- $\gamma$ -Produktion durch  $\alpha\beta$  T-Zellen regulieren und gegebenenfalls supprimieren.

## 5.2 Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen verbessert CED

Nachdem die Ergebnisse aus den Versuchen zur  $\gamma\delta$  T-Zelldepletion und –defizienz den Schluss zuließen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen bei CED eine protektive und regulatorische Rolle spielen, wurde diese These durch den therapeutischen Einsatz von  $\gamma\delta$  T-Zellen im induzierbaren Mausmodell verifiziert. Der Transfer von  $\gamma\delta$  T-Zellen vor

Colitisinduktion konnte zwar die Entstehung einer Colitis nicht verhindern, erhöhte jedoch drastisch die Überlebensrate der Tiere. In diesem Modell war die erhöhte Mortalität der Tiere, die keine  $\gamma\delta$  T-Zellen transferiert bekamen (Sham-Gruppe) assoziiert mit einer schwerwiegenden Schädigung des intestinalen Epithels, die sich in erhöhten makroskopischen und histologischen Scores widerspiegelte. Auch das Zytokinprofil stand im Einklang mit diesen Ergebnissen. So sezernierten LPL transferierter Tiere vermehrt IL-10 und TGF- $\beta$  und vermindert TNF- $\alpha$ , was auf eine verbesserte Wundheilung und immunologische Balance schließen lässt. Dieser Effekt zeigte sich auch in lymphatischen Geweben. So sezernierten Splenozyten von  $\gamma\delta$  T-Zell transferierten Tieren ebenfalls vermehrt IL-10 und TGF- $\beta$  und vermindert TNF- $\alpha$ , mLKL wiesen ebenfalls eine erniedrigte TNF- $\alpha$ -Sekretion auf. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen, die für den Transfer verwendet wurden, stammten entweder aus Wt Mäusen (B6-Spendertiere) oder aus Mäusen, die IL-10 überexprimieren (IL10 tg-Spendertiere). Es kann vermutet werden, dass der protektive Effekt der  $\gamma\delta$  T-Zellen ausgeprägter wäre, wenn sie aus IL10 tg-Spendertieren gewonnen wurden. Dies traf im vorliegenden Versuch nicht zu. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen von B6-Spendern wiesen das gleiche protektive Potenzial auf wie  $\gamma\delta$  T-Zellen aus IL10 tg-Spendern. Hinsichtlich der Überlebensrate, den Scores und des Zytokinprofils zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, die B6- $\gamma\delta$  T-Zellen und denen, die IL10 tg- $\gamma\delta$  T-Zellen transferiert bekamen. Ebenso zeigte sich kein Effekt des Transfers von IL10 tg- $\gamma\delta$  T-Zellen auf die Sekretion dieses Zytokins durch die Lymphozyten des Empfängers. Die Konzentration an sezerniertem IL-10 durch mLKL, Splenozyten oder LPL war zwischen den beiden Versuchsgruppen vergleichbar. Vermutlich erfolgt die Regulation der immunologischen Balance durch  $\gamma\delta$  T-Zellen eher über den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  als über das Zytokin IL-10. Diese Hypothese muss durch weitergehende *in vitro*- und *in vivo*-Experimente untermauert werden.

Diese protektiven Effekte infolge  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer zeigten sich bei etablierter Colitis weniger ausgeprägt, was wiederum auf eine Beteiligung der  $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem im frühen Entzündungsgeschehen spräche. Betrachtet man jedoch die makroskopischen und histologischen Scores, zeigt sich, dass die Tiere in diesem Versuch weniger empfänglich für die TNBS-induzierte Colitis waren als im vorherigen. Zeigten Sham-Tiere im vorherigen Versuch noch eine sehr ausgeprägte Epithelschädigung

mit maximalem makroskopischen und histologischen Score, war die intestinale Schädigung im vorliegenden Versuch nur mäßig (bei mittleren Scores). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass sich der protektive Effekt der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei etablierter Colitis vermutlich weniger ausgeprägt darstellte, weil auch die Schwere der Colitis weniger ausgeprägt war. So zeigte sich zwar kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Gewichtsverläufe und Überlebensrate der Tiere, der makroskopische sowie histologische Score waren infolge  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer jedoch statistisch signifikant erniedrigt. Ferner ähneln sich auch die Zytokinprofile der beiden Transferversuche. Der  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer bei etablierter Colitis resultierte ebenfalls in einer erhöhten Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  und einer erniedrigten Sekretion von TNF- $\alpha$  durch LPL. D.h. die erhöhte Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  förderte vermutlich einerseits die Wundheilung, andererseits wurde das Epithel weniger durch TNF- $\alpha$  geschädigt (direkt und indirekt). Dieses Zytokinprofil zeigte sich auch in lymphatischen Geweben; mLKL und Splenozyten sezernierten infolge  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer vermehrt IL-10 und TGF- $\beta$  und vermindert TNF- $\alpha$ . Verwirrend ist allerdings die vermehrte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch mLKL infolge  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer bei etablierter Colitis. Da die erhöhte Sekretion in den mesenterialen Lymphknoten und nicht direkt im Kolon stattfand, wurde durch das IFN- $\gamma$  jedoch keine direkte Gewebeschädigung vermittelt. Vergleicht man die erhöhten Konzentrationen im vorliegenden Fall ( $\sim 5$  ng/mL) mit den Konzentrationen, die in den Depletions- und Defizienzversuchen gemessen wurden (30-1.200 ng/mL), zeigen die mLKL infolge  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer eine vielfach geringere IFN- $\gamma$ -Sekretion, die vermutlich weniger schädlich ist. Ausserdem drängt sich im vorliegenden Versuch die Frage auf, warum der  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer keinen regulatorischen bzw. supprimierenden Effekt auf die Sekretion von IFN- $\gamma$  zeigte. Vielmehr blieb die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch Splenozyten und LPL vom  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer unberührt. Ursächlich hierfür ist vermutlich, dass IFN- $\gamma$  bei der Pathogenese der TNBS-induzierten Colitis in der Maus eine untergeordnete Rolle spielt<sup>186</sup>, vielmehr werden erhöhte Spiegel an IL-12 und TNF- $\alpha$  beschrieben<sup>105</sup>. Ferner zeigt sich durch das Zytokinprofil in den Lymphorganen, dass tatsächlich eine Immunreaktion in diesen Tieren stattgefunden hat und dass das Kolon nicht nur chemisch geschädigt wurde. Somit bestätigt sich, dass eine TNBS-Colitis in scheinbar resistenten C57BL/6-Mäusen durch Vorsensitivierung induzierbar ist. Die erhöhten Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im Blutbild der Sham-Tiere

bestätigen eine akute Entzündung in diesen Tieren. Da ein Trend zu erhöhten Neutrophilen- und erniedrigten Lymphozytenwerten vorlag, kann man auf die erste der drei Entzündungsphasen schließen, d.h. die Tiere befanden sich in der sogenannten „neutrophilen Kampfphase“.

### 5.3 $\gamma\delta$ T-Zellen sind anerg und wirken supprimierend

Die protektive Wirkung von  $\gamma\delta$  T-Zellen bei CED konnte in verschiedenen Tiermodell nachgewiesen werden. Zum einen wirkte sich die Depletion bzw. Defizienz von  $\gamma\delta$  T-Zellen in vielen verschiedenen CED-Modellen (Depletion und Defizienz bei chemisch-induzierter Colitis, im immunologischen Colitis-Modell und im immunologischen Crohn-Modell) negativ aus, zum anderen zeigte sich ein milderer Krankheitsverlauf der TNBS-induzierten Colitis infolge  $\gamma\delta$  T-Zelltransfer. Um eine  $\gamma\delta$  T-Zell basierende Therapie für die Behandlung von CED-Patienten zu entwickeln, muss allerdings die Brücke ins humane System geschlagen werden. Daher wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen aus humanen PBL gesunder Spender isoliert und charakterisiert. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, benötigt man für die Kultivierung  $\gamma\delta$  T-Zellen von sehr hoher Reinheit (>98%), die mit der angewandten Aufreinigung mittels MACS erzielt werden konnte. In Proliferationsversuchen zeigte sich, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu PBL anerg sind. Hinsichtlich ihrer Anergie sind sie sogar mit regulatorischen  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen vergleichbar. Allerdings muss man hierbei berücksichtigen, dass es verschiedene regulatorische  $CD4^+CD25^+$  T-Zellpopulationen gibt: zum einen die natürlich vorkommenden  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, zum anderen Th3 Zellen, die durch orale Antigen-Exposition induziert werden und Tr1 Zellen, die infolge *in vitro*-Kultivierung mit IL-10 generiert werden<sup>20, 187</sup>. Im vorliegenden Versuch wurden *in vitro*-Eigenschaften von natürlich vorkommenden  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, die aus humanen PBL mittels MACS isoliert wurden, miteinander verglichen. Die Anergie der regulatorischen T-Zellen mag unter anderem auf der verminderten Eigensekretion des Wachstumsfaktors IL-2 beruhen. Die Messung der Zytokinkonzentration aus dem Zellkulturüberstand sowie die intrazelluläre Zytokinbestimmung zeigten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen vernachlässigbar geringe Mengen an IL-2 produzieren. Für  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen ist ebenfalls beschrieben, dass sie kein IL-2 produzieren<sup>15, 188</sup>. Im Gegensatz zu  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, deren

Anergie durch Zugabe von exogenem IL-2 aufgehoben werden kann<sup>13-15</sup>, konnte die Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen zwar durch die Zugabe von rIL-2 leicht gesteigert werden, die Anergie blieb jedoch erhalten. Es scheinen demnach noch weitere Mechanismen die Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen einzudämmen. Da das Vorkommen der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu  $\alpha\beta$  T-Zellen sehr gering ist, mag man sich fragen, was diese kleine Population überhaupt ausrichten kann, wenn sie zudem auch noch, zumindest *in vitro*, anerg ist. Versuche zur supprimierenden Wirkung der  $\gamma\delta$  T-Zellen in allogenen Cokulturen zeigten nicht nur, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen das Wachstum von  $CD4^+$  T-Zellen via Zell-Zell-Kontakt hemmen, sondern dass sie dies schon in sehr geringen Zellverhältnissen (1:0,25) tun. D.h. das anergische Verhalten der  $\gamma\delta$  T-Zellen verhindert zum einen eine unkontrollierte Ausbreitung dieser Zellen infolge Infektion oder Entzündung und zum anderen ist diese kleine  $\gamma\delta$  T-Zellpopulation in der Lage, autoreaktive Entzündungszellen in ihrer Ausbreitung zu hemmen. Diese beiden Eigenschaften machen humane  $\gamma\delta$  T-Zellen zum potenziellen Kandidaten für die Behandlung von CED. Obwohl auch für regulatorische  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen sowohl anerge als auch supprimierende Eigenschaften beschrieben sind<sup>13, 23, 187</sup>, besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen einen wesentlichen Vorteil gegenüber den  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen: die supprimierende Wirkung der  $\gamma\delta$  T-Zellen blieb auch unter Zugabe von rIL-2 bestehen, während sich die supprimierende Wirkung der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen reduzierte. Der Verlust der supprimierenden Wirkung von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen unter Zugabe von exogenem IL-2 ist auch in der Literatur beschrieben<sup>187, 189</sup>. Die Suppression durch  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen erfolgt über die Inhibierung der IL-2-Produktion der Zielzelle und wird zytokinunabhängig durch Zell-Zell-Kontakt vermittelt<sup>13</sup>. Für  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen ist beschrieben, dass sie ihre supprimierende Wirkung nicht nur direkt vermitteln, sondern dass sie in der Lage sind,  $CD4^+$  T-Zellen zu anergisieren, d.h. sie induzieren in diesen Zellen die Produktion von IL-10, wodurch diese supprimierend auf syngenetische  $CD4^+$  T-Zellen wirken<sup>190, 191</sup>. Weiterführende Versuche sollten sich mit der Fragestellung beschäftigen, ob dies auch für  $\gamma\delta$  T-Zellen zutreffen könnte. Vergleicht man abschließend das Zytokinprofil von  $\gamma\delta$  T-Zellen und natürlich vorkommenden  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen zeigen sich Ähnlichkeiten. Physiologisch stimulierte (anti-CD3/CD28)  $\gamma\delta$  T-Zellen produzieren vernachlässigbar geringe Mengen an IL-2, jedoch große Mengen an IL-10, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Dieses Profil zeigte sich auch für

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, obwohl diese geringere Mengen an TGF- $\beta$  sezernierten. In der Literatur fanden sich vergleichbare Konzentrationen, so sezernierten anti-CD3/CD28-stimulierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen ~300 pg/mL IL-10, <100 pg/mL IL-2 und IL-4 sowie 50-6.000 pg/mL IFN- $\gamma$ <sup>13, 188</sup>. Levings et al. fanden nach Stimulation via anti-CD3/CD28 + IL-2 eine Konzentration von 1.300 pg/mL TGF- $\beta$  im Kulturüberstand<sup>22</sup>. Zusammenfassend wird festgestellt, dass sich  $\gamma\delta$  T-Zellen aufgrund ihres Profils nicht nur für die CED-Therapie anbieten, sondern, dass sie einige Vorteile gegenüber regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen. So besitzen sie ebenfalls anerge und supprimierende Eigenschaften, die unter Zugabe von IL-2 jedoch irreversibel sind. Ferner sezernieren sie ebenfalls große Mengen an antiinflammatorischen und protektiven Zytokinen und können somit zur Wundheilung und Wiederherstellung der immunologischen Balance beitragen. Gleichzeitig sind sie durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  zur Infekt- und Tumorabwehr befähigt<sup>51</sup>. So spielt zum einen von  $\gamma\delta$  T-Zellen sezerniertes IFN- $\gamma$  eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Tumorummunität<sup>192, 193</sup>, zum anderen ist eine verstärkte Tumorbildung in  $\gamma\delta$ TCR ko Mäusen zu beobachten<sup>194, 195</sup>.

#### **5.4 $\gamma\delta$ T-Zellen lassen sich *in vitro* expandieren**

Durch ihr Zytokinprofil, ihre Anergie und supprimierenden Eigenschaften bieten sich  $\gamma\delta$  T-Zellen auch im Menschen zur Behandlung von CED an. Ihre geringe Verteilung im peripheren Blut (3-5%) stellt allerdings ein Hindernis für die zellbasierende Therapie dar. Ferner wird die Kultivierung aufgrund ihrer Anergie erschwert. Daher ist die Entwicklung einer *in vitro*-Anreicherung, die hohe Ausbeuten unter Beibehaltung des regulatorischen Phänotyps liefert, unbedingt erforderlich. Da V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen im Blut vorherrschen und nicht-peptidische Phospho-Antigene und Alkylamine direkt erkennen können<sup>46, 196, 197</sup>, wurden verschiedene Expansionsmethoden getestet, die die Stimulation humaner PBL mit synthetischen Phospho-Antigenen beinhalteten. Zu den synthetischen Phospho-Antigenen zählen Bromhydrinpyrophosphat (BrHPP), Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Aminobiphosphonate (ABP). Unter die ABP fallen Substanzen wie Pamidronat und Zoledronat. Von den getesteten Expansionsmethoden zeigten sich zwei als erfolgsversprechend: zum einen ließen sich  $\gamma\delta$  T-Zellen gut aus PBL-Kulturen durch IPP-Stimulation (5  $\mu$ g/mL IPP und

50 U/mL rhu IL-2) anreichern, zum anderen mit 1 µg/mL Alendronat (Fosamax®) und 100 U/mL rhu IL-2 unter Th2-„priming“ Bedingungen (10 ng/mL rhu IL-4, 5 µg/mL anti-IL-12). Beide Ansätze lieferten über einen Zeitraum von drei Wochen eine bis zu 16-fache Anreicherung der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Essentiell für die Kultivierung erwies sich der Zusatz von rhu IL-2, da sonst keine vitalen Zellen generiert werden konnten. Ebenso sollte ein zu häufiges Splitting der Kulturen vermieden werden; im vorliegenden Versuch erwiesen sich relativ lange Kultivierungsintervalle, d.h. ein Splitting alle 5-7 Tage als optimal. Ein häufigeres Splitting führte zum Absterben der Zellen. Nach drei Wochen, wenn eine deutliche Zunahme der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Kultur zu beobachten ist, sollte man tote Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus der Kultur entfernen, um negative Einflüsse, die direkt von diesen apoptotischen Zellen vermittelt werden oder durch die Freisetzung bestimmter Stoffe infolge der Apoptose, zu minimieren. Zukünftige Experimente sollten sich mit der Optimierung, dem scale-up und der Überprüfung des regulatorischen Phänotyps der angereicherten  $\gamma\delta$  T-Zellen beschäftigen. In der Literatur ist die Stimulation mittels IPP und ABP zur Anreicherung von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus humanen PBL-Kulturen seit 2000 beschrieben<sup>43, 44, 197-199</sup>, wobei in diesen Ansätzen vor allem aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen mit zytotoxischem Potenzial und anti-Tumoraktivität generiert wurden. Besonders hervorgehoben werden sollten in diesem Zusammenhang die neusten Ergebnisse zur  $\gamma\delta$  T-Zell basierenden Immuntherapie bei Krebserkrankungen: Wilhelm et al. behandelten in einer klinischen Studie Non-Hogkin-Lymphom-Patienten mit einer Kombination von Pamidronat und IL-2 und erzielten *in vivo* eine Expansion und Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit anti-lymphomischer Aktivität<sup>198</sup>. Mittlerweile wird dieses Präparat unter dem Namen Phosphostim® von der Firma Innate Pharma zur onkologischen Therapie vertrieben. Mit dem Ziel einer  $\gamma\delta$  T-Zell basierenden Therapie sollte die Generierung regulatorischer  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Behandlung von CED-Patienten weiter untersucht werden.