# Einfluss von Interleukin-2 und Interleukin-12 auf γδ T-Zellen im Haushuhn

von Antonia Elisabeth Linti

### Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

#### der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

## Einfluss von Interleukin-2 und Interleukin-12 auf γδ T-Zellen im Haushuhn

von Antonia Elisabeth Linti

aus München

München 2024

us dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakulta	ät
der Ludwig-Maximilians-Universität München	
Lehrstuhl für Physiologie	

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

## Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Herbert Kaltner

Prof. Dr. Monika Rinder

Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Tag der Promotion: 06. Juli 2024

Für Indra, die mich zum Tiermedizin-Studium inspiriert hat

INHALTSVERZEICHNIS

#### **INHALTSVERZEICHNIS**

1	EINLEITUNG	· 1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
	2.1 Bedeutung von Hühnern für Bevölkerung und Wirtschaft	3
	2.2 Hühner in der Immunologie – damals bis heute	
	2.3 Das adaptive Immunsystem	
	2.3.1 Komponenten des adaptiven Immunsystems	
	2.3.2 Aufbau der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen	7
	2.3.2.1 Aufbau der TCR-Ketten und ihre Diversität	
	2.3.2.2 Chromosomen der αβ und γδ TCR-Loci	
	2.3.2.3 Der CD3-Komplex der Säuger und des Haushuhns	
	2.3.2.4 CD4 und CD8 in Säuger und Haushuhn	
	2.3.2.4.1 CD4-Rezeptor	
	2.3.2.4.2 CD8-Rezeptor	- 10
	2.3.2.5 TCR-Signaling der Säuger und des Haushuhns	- 10
	2.4 γδ T-Zellen beim Säuger	- 12
	2.4.1 Entwicklung der γδ T-Zellen	
	2.4.2 Vorkommen der γδ T-Zellen	- 13
	2.4.3 Funktionen der γδ T-Zellen	- 14
	2.4.4 <i>In vitro</i> -Verhalten von γδ T-Zellen	- 16
	2.5 γδ T-Zellen beim Huhn	- 18
	2.5.1 Entwicklung der γδ T-Zellen	
	2.5.2 Vorkommen der γδ T-Zellen	- 18
	2.5.3 Funktionen der γδ T-Zellen	
	2.5.4 <i>In vitro</i> -Verhalten von γδ T-Zellen	- 20
	2.6 Repertoireanalysen des T-Zellrezeptors	- 22
	2.6.1 γδ TCR-Repertoire des Säugers	- 22
	2.6.2 γδ TCR-Repertoire des Haushuhns	- 23
2	ZIELSETZUNG	25
3	PUBLIKATION	
4	SUPPLEMENTARY MATERIAL	
5	DISKUSSION	
6		
	6.1 $$ γδ T-Zellen proliferieren in vitro nach IL-2- und IL-12-Stimulation von Milzzellen	
	6.2 Verschiedene γδ T-Zell-Populationen reagieren auf Zytokinstimulation	
	$6.3~$ Zytokinstimulation von ү $\delta$ T-Zellen führt zu einem eingeschränkten TCR-Repertoire-	- 58
7	ZUSAMMENFASSUNG	. 62
8	SUMMARY	
9	LITERATURVERZEICHNIS	
ว 1(	DANKSAGUNG	
ı١		· U/

#### **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AK	Antikörper
BCR	B-Zellrezeptor
BrdU	Bromodesoxyuridin
CD	Cluster of Differentiation
CDR1,2,3	Complementarity Determining Region 1, 2, 3
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CXCL13	C-X-C motif chemokine 13
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3
DETC	Dendritic Epidermal T cells
EGF1	Epidermal Growth Factor 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPCR	Endothel-Protein-C-Rezeptor
ET	Embryonaltag
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GvHR	Graft-versus-Host-Reaktion
НМВРР	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HPAIV	High Pathogenic Avian Influenza Viruses
IFN-γ	Interferon-y
IgH	Immunoglobulin Heavy Chain
ĪĹ	Interleukin
IL-2R	IL-2-Rezeptor
IL-12R	IL-12-Rezeptor
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KGF (-1 / -2)	Keratinocyte Growth Factor (-1 / -2)
mAK, mAb	Monoklonaler Antikörper, monoclonal antibody
MDV	Marek's Disease Virus
MHC-I/-II	Major Histocompatibility Complex-I/-II
NGS	Next Generation Sequencing
NKG2D	Natural Killer Group 2, Member D
NK T-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
OX40L	OX-40 Ligand
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBL	Peripheral Blood Lymphocyte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
(5') RACE	(5') Rapid Amplification of cDNA-ends
RAG-1/-2	Recombination-Activating Gene-1/-2
RSS	Recombination Signal Sequence
SSW	Schwangerschaftswoche

STAT4	Signal Transducer and Activator of Transcription 4
TCR	T-Zellrezeptor
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TRGV-/TRDV-Segment	T-Zellrezeptor gamma/delta V-Segment
ULBP4	UL 16-binding Protein 4
UMI	Unique Molecular Identifier
V/D/J/C	Variable/Diversity/Joining/Constant

EINLEITUNG 1

#### 1 EINLEITUNG

Das Immunsystem dient der Bekämpfung jeglicher Art von Infektionen durch Pathogene, denen der Körper ausgesetzt ist. Die Erforschung der Abwehrmechanismen des Körpers ist dahingehend wichtig, dass durch ihr Verständnis verschiedene Möglichkeiten eröffnet werden, die einzelnen Vorgänge zu beeinflussen, zu unterstützen oder auch zu unterbinden. Bei Wirbeltieren werden angeborene und adaptive Immunantworten unterschieden, wobei der adaptive Ast des Immunsystems aus humoralen und zellulären Antworten besteht. Humorale Antworten werden durch Antikörper (AK), produziert von B-Zellen, ausgeführt und zelluläre Antworten durch T-Zellen. Letztere können nochmals aufgrund ihres T-Zellrezeptors (TCR) in  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen (1-3) unterteilt werden, die ihre Variabilität durch somatische Rekombination erhalten.

Gerade Hühner (Gallus gallus domesticus) waren und sind wichtige Modell-Versuchstiere für die Immunologie. Schon vor über 100 Jahren führten sie zu wichtigen immunologischen Erkenntnissen bezüglich der Relevanz von Lymphozyten, unter anderem beim Schutz vor Infektionen und der Tumorabwehr (4-6). Durch Experimente mit Hühnern kamen Glick und Chang et al. 1956 (7) zu der Erkenntnis, dass es verschiedene Lymphozyten gibt, die wir heute als B- und T- Zellen kennen.

Vor allem für die Untersuchung der  $\gamma\delta$  T-Zellen bieten sich Hühner an, da bis zu 50% der T-Zellen in der Peripherie diesen TCR tragen (8).

Zur Funktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen ist, im Gegensatz zu den B-Zellen und den  $\alpha\beta$  T-Zellen, noch nicht viel bekannt, was eventuell auch darin begründet liegt, dass viele Erkenntnisse durch die Erforschung von Mäuse-, Ratten- oder Menschen- $\gamma\delta$  T-Zellen gewonnen wurden, welche zu den Spezies mit einer niedrigen  $\gamma\delta$  T-Zell-Frequenz gehören (9-11). Da beim Huhn die Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Zellen so hoch ist, ist anzunehmen, dass diesen Zellen durchaus eine tragende Rolle im Immunsystem zukommt, was eine weitere Erforschung unabdingbar macht.

Um  $\gamma\delta$  T-Zellen ausreichend untersuchen zu können, wäre die Etablierung eines Langzeitkultursystems von Nutzen, das dann für ein besseres Verständnis der Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen durch Untersuchen ihres Verhaltens in Kultur, zur Liganden-Suche und für Infektionsversuche genutzt werden könnte.

Auch die Analyse des Repertoires von  $\gamma$  und  $\delta$  T-Zellrezeptoren in Hühnern würde zu einem besseren Verständnis dieses wichtigen Zelltyps beitragen. Aufgrund einer unvollständigen Annotation des  $\delta$ -Locus im Hühnergenom war eine Charakterisierung des  $\gamma\delta$  TCR-Repertoires für die  $\delta$ -Kette zuvor aber nicht möglich, weshalb es bisher nur Studien zur  $\gamma$ -Kette gibt (12,13).

Diese Arbeit beschreibt die Etablierung einer Langzeitkultur von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Hühnermilz mithilfe der beiden Zytokine IL-2 und IL-12, die Charakterisierung der kultivierten Zellen, und eine TCR-Repertoireanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten in der Zellkultur. Letztere wurde durch die Erstellung einer bioinformatischen Pipeline und der Annotation des Huxu-Hühnergenoms (14) für die  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  V-Gensegmente in unserem Labor ermöglicht (15).

#### 2 LITERATURÜBERSICHT

#### 2.1 Bedeutung von Hühnern für Bevölkerung und Wirtschaft

Die Haltung von Hühnern begann schon vor mehreren tausend Jahren. Unser heutiges Haushuhn (Gallus gallus domesticus) wurde aus dem Bankivahuhn (Gallus gallus) gezüchtet (16-18). Anfangs als Haustier gehalten und teils sogar als Orakel verehrt, wandelte sich seine Bedeutung im Römischen Reich Richtung Nutztier: das Huhn und seine Eier dienten nun auch der Ernährung (19).

Heute sind Hühner auf der ganzen Welt die häufigsten anzutreffenden Nutztiere, an die 26 Milliarden Tiere wurden 2021 weltweit laut dem Statistischen Bundesamt gehalten, was eine Steigerung um 79% im Vergleich zu 2001 darstellt (20).

In Deutschland betrug der Geflügelfleischkonsum (Huhn, Ente, Gans, Perlhuhn, Pute/Truthahn), Stand 2022, pro Kopf und Jahr 12,7 kg, wovon über 70% Hühnerfleisch waren, der pro Kopf Konsum von Eiern betrug im Jahr 2023 236 Eier (21,22). Dadurch brachten diese beiden Nahrungsmittel der Landwirtschaft 5,1 Milliarden Euro ein.

Neben kommerziell gehaltenen Hühnern gibt es auch einige Hobbyhaltungen für den Eigenkonsum, und Liebhaberhaltungen vom Haushuhn oder besonderer Haushuhn-Rassen, wie dem Seidenhuhn und dem Holländer Haubenhuhn.

Durch diese Bedeutung von Hühnern für die Wirtschaft und auch die Bevölkerung stellen Krankheiten und Zoonosen, wie unter anderem *Campylobacter spp.* und *Salmonella Enteritidis*, übertragen durch unzulängliche Küchenhygiene im Umgang mit Fleisch und Eiern, eine stetige Gefahr dar. Gerade *Campylobacter spp.*, vor allem *C. jejuni* auf Hühnerfleisch, zählt seit Jahren zu den häufigsten Auslösern einer Magen-Darm-Erkrankung in Deutschland (23).

Zudem führen die wiederkehrenden Ausbrüche der aviären Influenza mit dem HPAIV H5N1 immer wieder zu hohen Verlusten in der Geflügelhaltung und zu massiven Einschränkungen, worunter auch die Wirtschaft leidet. 2023 gab es allein in Deutschland über 1000 Fälle bei Wildvögeln und 65 Ausbrüche von H5N1 in Geflügelhaltungen. Dies führte zu Keulungen von fast 200.000 Tieren nur im Dezember 2023. Auch aktuell, im Jahr 2024, werden immer wieder Ausbrüche angezeigt (24).

Aufgrund dieser Risiken und der Relevanz von Hühnern für Ernährung und dadurch Wirtschaft ist es umso wichtiger, das Haushuhn und sein Immunsystem zu erforschen, um die bestmögliche Tiergesundheit zu gewährleisten und die Belastung durch Zoonosen auf ein Minimum zu reduzieren.

#### 2.2 Hühner in der Immunologie – damals bis heute

Hühner und Säuger stammen von einem gemeinsamen reptilienartigen Vorfahren ab, aus welchem sie sich vor über 250 Millionen Jahren entwickelten. Daher stimmen sie in vielen, unter anderem auch immunologischen, Aspekten überein.

Durch die leichte Zugänglichkeit zu adulten Tieren und auch zu jeglichen embryonalen Stadien, seine geringe Körpergröße, und die Verfügbarkeit des gesamten Genoms stellt das Haushuhn (Gallus gallus domesticus) ein wichtiges immunologisches Modell dar.

Nachdem Edward Jenner entdeckte, dass eine Infektion mit dem Kuhpockenvirus (Cowpox-Virus) Menschen vor dem humanen Pockenvirus (Variola- bzw. Smallpox-Virus) schützte (25), wodurch er das Zeitalter der Impfungen einläutete (26,27), konnte Louis Pasteur ein Jahrhundert später, 1878, an diesen Entdeckungen Jenners' anknüpfen. Er traf bei der Erforschung von Geflügelcholera (*Pasteurella multocida*) an Hühnern auf einen Impfstoff aus attenuiertem Virus und bezeichnete es als Vakzin (28). Durch diese Methode fand er dann auch Vakzine gegen andere Krankheiten, wie Anthrax und Tollwut.

Zwischen 1912 und 1921 erforschte James Murphy die Übertragung von Rattentumoren auf Hühner und Hühnerembryonen und darauffolgendes Tumorwachstum oder dessen Abstoßung. Dadurch konnte er die essenzielle Beteiligung von Lymphozyten an der Graftversus-Host-Reaktion (GvHR) und am Schutz vor Infektionen nachweisen (4,5,29). Zu dieser Zeit schenkte man seinen Erkenntnissen jedoch nur wenig Beachtung. Erst 1956 griff Simonsen Murphys' Beobachtungen auf (30-32), sie erhielten Relevanz bezüglich Knochenmarkstransplantationen (33-37).

Die Existenz einer humoralen und einer zellulären Antwort war zwar bekannt, aber niemand konnte sich erklären, wie derselbe Lymphozyt beides bewerkstelligen kann (38).

1960 fanden dann Glick und Chang et al. (7) eher per Zufall heraus, dass für die humoralen und zellulären Antworten des adaptiven Immunsystems nicht nur ein Lymphozyt verantwortlich sein kann, sondern es zwei verschiedene geben muss, die aus unterschiedlichen Organen stammen. Glick führte Bursektomie-Versuche an Hühnern durch, um den potenziellen Effekt der Bursa auf das Wachstum zu untersuchen und Chang machte Versuche mit Salmonellen zur Antikörperproduktion. Als letzterer dann aber bursektomierte Hühner stimulierte, konnte er keine Antikörper mehr finden.

In der Bursa mussten sich also Zellen befinden, essenziell für die AK-Produktion. Ihren Namen erhielt die Bursa Fabricii aufgrund ihres Entdeckers, dem Vater der Embryologie, Hieronymus Fabricius d'Aquapendente im 17. Jahrhundert, obgleich ihm ihr Nutzen unbekannt blieb (39). Die Entdeckung von Glick und Chang et al. schuf Grundlage für das Wissen, dass es B- und T-Zellen gibt, "B" wegen Bursa-abstammend und "T" wegen Thymus-abstammend (40). Die Bursa war folglich essenziell für die Antikörper-mediierte Immunität und der Thymus für die Zell-mediierte Immunität (41-44). Cooper et al. (45) veröffentlichten schließlich 1965 ihre Arbeit zur Charakterisierung des B- und T-Zellsystems und stellten die These auf, dass Säuger aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zum Huhn in Lymph- und Immunsystem eine Alternative zur Bursa für die Entwicklung von B-Zellen haben müssten. Später konnte man dieser Aufgabe das Knochenmark zuordnen (46,47).

Auch die für angeborene Immunantworten wichtigen Interferone wurden erstmals im Huhn entdeckt (48).

Gerade in der heutigen Zeit ist die Erforschung des Hühner-Immunsystems von Bedeutung, schon allein wegen der enormen wirtschaftlichen Bedeutung des Huhns als Nutztier. Gerade die Etablierung oder Verbesserung von Impfstoffen ist wichtig, um die Gesundheit von Huhn und Mensch zu schützen. Eine Impfung gegen das Marek's Disease Virus (MDV) in den 1970ern stellte den ersten Impfstoff gegen eine natürliche Tumorerkrankung dar, musste aber aufgrund von Impfdurchbrüchen durch Evolution des Virus zu stärkerer Virulenz verbessert werden, und zwar durch Einsatz eines virulenteren Vakzins (49-51). Die Gefahr des Einsatzes von immer aggressiveren Vakzinen zur Bewahrung ihrer Wirksamkeit liegt in einer möglichen Schädigung des Patienten durch den Impfstoff selbst und auch in der Tendenz zur Entstehung immer virulenterer Viren (52).

1982 wurde dann die *in ovo*-Vakzinierung gegen MDV entdeckt. Dies stellte von dem her einen Durchbruch dar, da bisher nicht bekannt war, dass Wirbeltiere durch Impfung des Embryos erfolgreich vor einer Infektion kurz nach Schlupf oder Geburt geschützt werden können (53,54). Die genauen Mechanismen dahinter müssen jedoch noch geklärt werden.

Zusätzlich zur Weiterentwicklung von Impfstoffen gibt es heutzutage auch durch die Aufschlüsselung des Hühnergenoms (55) und neue molekularbiologische Methoden viele Möglichkeiten, das Huhn und seine Gene besser zu erforschen. So bietet die Manipulation des Genoms durch Gentransfer mithilfe viraler Vektoren (56,57) oder auch dem CRISPR/Cas9-System (58,59) die Möglichkeit, Hühner mit modifizierter Keimbahn zu erschaffen, und somit unter anderem ein besseres Verständnis für physiologische Funktionen und Abläufe zu schaffen.

Die Entwicklung von Knockout-Hühnern ermöglicht es ebenfalls, beispielsweise verschiedene T-Zellarten besser zu untersuchen und somit auch besser zu verstehen (60,61).

TCR-Repertoireanalysen der  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen können einen tieferen Einblick in dessen Verteilung in verschiedenen Geweben und auch vergleichend zwischen Individuen geben (12,13,62).

Nützliche Methoden, um die Hühner-Immunologie besser erforschen zu können, wären die Etablierung von Infektionsmodellen, von *in vitro*-Kultursystemen, z.B. für  $\gamma\delta$  T-Zellen, oder auch die Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAK) gegen regulatorische T-Zellen (63).

#### 2.3 Das adaptive Immunsystem

#### 2.3.1 Komponenten des adaptiven Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus angeborenen und adaptiven Komponenten, die beide dazu beitragen, Pathogene (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) zu bekämpfen (38,64-66). Sowohl angeborene als auch adaptive Mechanismen basieren auf Leukozyten.

Die angeborene Immunantwort setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, den anatomischen Barrieren, dem Komplementsystem und antimikrobiellen Peptiden sowie den angeborenen Immunzellen, wie Granulozyten und Makrophagen (67).

Kommt es zum Kontakt mit einem Pathogen, treten die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems sehr schnell in Kraft, nämlich innerhalb von Minuten bis Stunden, wobei sie nicht antigenspezifisch vorgehen, sondern eine begrenzte Zahl an Rezeptoren nutzen, um zwischen körpereigen und körperfremd zu unterscheiden (68-70).

Im Gegensatz dazu benötigt das adaptive Immunsystem deutlich mehr Zeit für seine Reaktion, nämlich mehrere Tage.

Adaptive Mechanismen greifen, wenn das angeborene Immunsystem überwunden wurde. Das adaptive Immunsystem arbeitet mit Lymphozyten, deren antigenspezifische Rezeptoren diese Art der Bekämpfung weitaus effektiver machen, indem die verschiedenen Pathogene gezielt angegriffen werden können.

Bis die Lymphozyten auf ihr passendes Antigen treffen, zeigen sie nur eine geringe Aktivität, weshalb man zwischen den naiven Lymphozyten, die noch nicht von einem Antigen aktiviert wurden, und den Effektor-Lymphozyten, die schon aktiviert wurden und sich weiterdifferenziert haben, unterscheidet (71).

Es gibt zwei verschiedene Arten von Lymphozyten, deren Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet werden: die B- und die T-Zellen, welche über verschiedene antigenspezifische Rezeptoren verfügen. B-Zellen besitzen den B-Zellrezeptor (BCR) auf ihrer Oberfläche, der sowohl in membrangebundener als auch sezernierter Form (Antikörper) vorliegt. T-Zellen besitzen hingegen den T-Zellrezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche, der nur membrangebunden vorliegt (67).

Diese beiden Arten von Lymphozyten haben verschiedene Funktionen im Immunsystem inne. B-Zellen, die beim Säuger im Knochenmark reifen und beim Vogel in der Bursa Fabricii, bilden nach der Bindung ihres spezifischen Antigens Plasmazellen, die im Anschluss gegen dieses Antigen wirksame Antikörper produzieren. Sie bilden den humoralen Ast der adaptiven Immunantwort.

T-Zellen, die bei Säuger und Vogel im Thymus reifen, bilden den zellulären Ast der adaptiven Immunantwort und können nach Aktivierung durch ihr spezifisches Antigen drei verschiedene Arten von Effektorfunktionen generieren. Zytotoxische T-Zellen zerstören infizierte Zellen. T-Helferzellen unterstützen andere Immunzellen in ihren Effektorfunktionen, wie B-Zellen und Makrophagen, meist mithilfe von Zytokinen, und können drei verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden (T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen). Regulatorische T-Zellen unterdrücken andere Lymphozyten und regulieren dadurch die Immunantwort (72-74).

Nach ihrer Reifung treten naive B- und T-Zellen ins Blut über und zirkulieren durch die sekundären lymphatischen Gewebe, in denen sie auf Antigene stoßen.

Im Gegensatz zum BCR und zu Antikörpern, die im Serum und im Extrazellularraum Antigene mehr oder weniger jeglicher Art bezüglich chemischer Strukturen erkennen können, binden

TCRs meist nur Proteinantigene eines Pathogens, deren Bruchstücke als Peptidfragmente von MHC-Transmembran-Glykoproteinen (Major Histocompatibility Complex) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Der TCR unterliegt dadurch in den meisten Fällen einer MHC-Restriktion, da er sowohl Teile des Antigens als auch Teile des MHC-Moleküls erkennen muss, um daran binden zu können (67,75,76).

MHC-Moleküle werden von dem MHC-Genkomplex codiert und wurden aufgrund ihres Einflusses auf die Immunantwort gegen transplantierte Gewebe entdeckt (77).

Eine der wichtigsten Funktionen des adaptiven Immunsystems, ohne die das Prinzip der Impfung nicht möglich wäre, ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses nach einer Infektion durch Differenzierung eines Teils der aktivierten Lymphozyten zu Gedächtniszellen. Diese ermöglicht bei erneuter Infektion mit demselben Pathogen (Sekundärinfektion) eine schnellere und effizientere Immunantwort (67,78,79).

#### 2.3.2 Aufbau der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen

T-Zellen der Säuger und der Vögel können, zusätzlich zu ihrer oben beschriebenen funktionalen Differenzierung, in  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen eingeteilt werden, die sich durch den jeweiligen TCR auf ihren Oberflächen unterscheiden. Dieser Rezeptor ist ein Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, verknüpft über eine Disulfidbrücke zwischen den Cystein-Resten seiner kurzen Stielregion, und besteht bei  $\alpha\beta$  T-Zellen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette und bei  $\gamma\delta$  T-Zellen aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette (1-3). Er besitzt nur eine Antigen-Bindungsstelle (67). Alle Kiefermäuler weisen diese 4 Ketten auf (63), mit Ausnahme der Reptilien, genauer der Ordnung der Schuppenkriechtiere, bei welcher keine  $\gamma\delta$  T-Zellen vorhanden sind (80).

#### 2.3.2.1 Aufbau der TCR-Ketten und ihre Diversität

Die  $\alpha$ - und γ-Ketten sind kürzer als die  $\beta$ - und  $\delta$ -Ketten (63). Jede der Ketten besteht aus zwei Immunglobulin-Superfamilien, und zwar einer konstanten und einer aminoterminalen variablen Region. Letztere wird bei Säuger und Huhn während der T-Zell-Reifung im Thymus durch somatische DNA-Rekombination von V- (Variable), (D-) (Diversity) und J- (Joining) Genen gebildet und ist einzigartig. Zusätzlich können während der Rekombination noch einzelne Nukleotide an den Verknüpfungsstellen zwischen den Gensegmenten eingefügt oder entfernt werden, und zwar mittels Basen-Deletionen durch Exonuklease-Aktivität oder kurze palindromische P- (template) bzw. nicht codierte N- (non-template) Nukleotid-Additionen, was die Diversität des Rezeptors weiter erhöht, genannt junktionale Diversität (67). Die Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) ist ein essenzielles Enzym für diese Addition von Nukleotiden während der V(D)J-Rekombination (81). Die beiden Ketten auf der Zelloberfläche werden ebenfalls zufällig kombiniert, wodurch sie zur Diversität beitragen. Diese Diversität ist dann nach der Reifung im Thymus abgeschlossen und ändert sich auch nach Antigen-Erkennung nicht.

Zusammenfassend kann zur Diversität des TCR-Repertoires also gesagt werden, dass drei Mechanismen zu ihrer Erhaltung und Steigerung beitragen, nämlich die Rekombination, die Modifikation der Verknüpfungsstellen, und die Paarung der Ketten (63).

Die variable Region von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ketten besteht aus V- und J-Segmenten und die variable Region von  $\beta$ - und  $\delta$ -Ketten aus V-, D- und J-Segmenten. Das Einfügen eines D-Segments zwischen V und J erhöht die Diversität des Rezeptorrepertoires der  $\beta$ - und der  $\delta$ -Kette (82).

Bei  $\alpha$  und  $\gamma$  bindet ein V- an ein J-Segment, bei  $\beta$  und  $\delta$  bindet erst ein D- an ein J-Segment und dann ein V- an das DJ-Segment. Beim Huhn konnte man aber bei  $\beta$  zum selben Zeitpunkt VD- und DJ-Rearrangements finden, dies scheint dort also offenbar nicht so strikt abzulaufen wie beim Säuger (63,83). Nach Kombination von V(D)J werden die zwischen diesen Genen liegenden Regionen ausgeschnitten. Vermittelt wird die Rekombination durch Enzyme, codiert durch Recombination-Activating Genes 1 und 2 (RAG1 und RAG2) (84,85). Sie werden durch Recombination Signal Sequences (RSS) angeleitet, welche in der Nähe jedes V-, D- und J-Gens liegen. Während der Transkription werden dann die V(D)J-Gene mit einem C- (Constant) Gen verbunden. Sowohl RAG als auch TdT wurden im Huhn charakterisiert (63,86,87).

Die TCR-Cluster auf den jeweiligen Chromosomen bestehen aus mehreren 5' V-Gensegmenten, gefolgt von D- und J-Gensegmenten, und schließlich einem oder mehreren 3' C-Gensegmenten. Bei Säugern findet man ein konserviertes V $\delta$ -Gen in reverser Orientierung, also Downstream vom C $\delta$ -Gen, ein solches V $\delta$ -Gen scheint es beim Huhn nicht zu geben. Alle 4 Ketten enthalten beim Huhn jeweils nur eine einzelne C-Region, die die Art der TCR-Kette bestimmt (63).

Die variable Region bildet die Antigen-Bindungsstelle. Die hypervariablen Regionen CDR1 und CDR2 (Complementarity Determining Regions 1 und 2) werden von den V-Gensegmenten gebildet und sind verantwortlich für die Bindung an den Peptid:MHC-Komplex, und CDR3 wird von den V(D)J-Verknüpfungsstellen gebildet (88). Die CDR3-Region des γδ TCR ist länger als die des αβ TCR, was vermutlich einen Effekt auf die Art der erkannten Antigene hat. Womöglich interagiert die CDR3-Region des γδ TCR direkt mit den Liganden (67). CDR3 ist verantwortlich für die hohe Antigenspezifität des TCRs (89), und zeigt eine hohe, durch somatische Rekombination generierte, Sequenz-Diversität (90), sowie eine im Vergleich zu CDR1 und CDR2 erhöhte Variabilität durch zufällige Basen-Inserts und Basen-Deletionen. Die konstante Region des TCRs verankert den Rezeptor über eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Zellmembran und nimmt an der Signaltransduktion teil (88). Der TCR gibt der Zelle nämlich nach der Bindung des spezifischen Peptids das Signal zur Aktivierung, er steht intrazellulär mit Signaltransduktions-Komplexen in Verbindung. Das Signaling wird aber vom CD3-Komplex durchgeführt, da die Ketten des TCR nur kurze zytoplasmatische Regionen aufweisen, somit also nicht selbst das Signaling einleiten können (63).

#### 2.3.2.2 Chromosomen der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ TCR-Loci

Die Gene der TCR-Ketten liegen auf verschiedenen Chromosomen. Nur  $\alpha$ - und  $\delta$ -Gene liegen sowohl beim Huhn (91) als auch beim Säuger (92-96) zusammen auf einem Chromosom. Hierbei befinden sich die  $\delta$ -Gene eingebettet zwischen den V $\alpha$ - und J $\alpha$ -Genen. Die Rekombination des TCR $\alpha$ -Locus führt zur Exzision des  $\delta$ -Clusters (91). Manche der V $\alpha$ -Gensegmente können aber auch mit einem, beiden oder keinem D $\delta$ - und einem J $\delta$ -Gen verknüpft werden, was wiederum die kombinatorische Diversität erhöht (82,93).

Beim Menschen liegen die Gene für TCRγ auf Chromosom 7 (97,98), für TCRβ ebenfalls auf Chromosom 7 (99) und für TCRα und TCRδ zusammen auf Chromosom 14 (100-103). Beim Huhn liegen die Gene für TCRγ auf Chromosom 2 (82,104), für TCRβ auf Chromosom 1 (82,105) und für TCRα und TCRδ zusammen auf Chromosom 27 (82,106). Zusätzlich existiert bei galliformen Vögeln ein zweiter TCRδ-Locus, der auf Chromosom 10 liegt und nur aus einem

VH-, einem D-, einem J- und einem C-Gen besteht (107). Dieses V $\delta$ -Gen ist näher verwandt mit IgH V-Segmenten der Antikörper als mit einem anderen TCR V-Segment, deshalb wird es als VH-Segment bezeichnet. Der Nutzen dieses zweiten  $\delta$ -Locus ist bisher nicht bekannt, vermutet werden ein Mitwirken in der Liganden-Erkennung oder in einer bestimmten  $\gamma\delta$  T-Zell-Funktion (63).

Bei anderen Vögeln sind die TCR-Loci noch nicht bekannt, außer bei der weißen Pekingente und dem Zebrafink (107,108). Die meisten Loci der Pekingente gleichen dem Haushuhn, nur der TCR $\beta$  weicht ab, er enthält zwei C $\beta$ -Gensegmente und zeigt eine umgekehrte Abfolge der Segmente von 3' nach 5'. Beim Zebrafink gibt es zwei C $\delta$ -Gene, sein VH $\delta$ -Segment liegt zusammen mit dem TCR $\alpha/\delta$ -Cluster auf Chromosom 27.

#### 2.3.2.3 Der CD3-Komplex der Säuger und des Haushuhns

CD3 ist ein unentbehrlicher Bestandteil des TCR-Komplexes und hat drei wichtige Funktionen. Es ist nötig für die Assemblierung des TCR-Komplexes, kontrolliert dessen Oberflächenexpression, und löst die Signaltransduktion nach TCR-Ligation aus (109).

CD3 des Menschen besteht bei  $\alpha\beta$  und bei  $\gamma\delta$  T-Zellen aus einem Komplex aus CD3 $\gamma$ -, CD3 $\epsilon$ -, CD3 $\epsilon$ -Genen und einem  $\zeta\zeta$ -Homodimer. Seine Ketten formen dafür vor der Assemblierung mit dem TCR zwei Dimere, einmal das CD3 $\gamma$ -CD3 $\epsilon$ -Heterodimer und einmal das CD3 $\delta$ -CD3 $\epsilon$ -Heterodimer. Vermutlich sind die drei CD3-Gene infolge einer schrittweisen Evolution aus nur einem Gen entstanden (110,111).

CD3 im  $\gamma\delta$  TCR-Komplex der Maus zeigt nur CD3 $\gamma$ - und CD3 $\epsilon$ -Gene, aus denen für den Komplex zwei Heterodimere gebildet werden, aber kein CD3 $\delta$ -Gen (112).

CD3 des Huhns weist zwei Gene auf, ein CD3 $\epsilon$ -Homolog und ein CD3 $\gamma$ / $\delta$ -Gen (113-115), die für den Komplex zwei Heterodimere bilden. Diese Gene sind wahrscheinlich aus einem Vorfahren durch Genduplikation entstanden. Das heißt, der CD3-Vorfahr wurde dupliziert, es entstanden CD3 $\gamma$ / $\delta$ - und CD3 $\epsilon$ -Gene in Fischen, Amphibien und Hühnern (116-118), im Säuger erfolgte dann, wie schon beschrieben, die zweite Duplikation, in deren Folge CD3 $\gamma$ - und CD3 $\delta$ -Gene entstanden.

Sowohl CD3 $\gamma/\delta$ - als auch CD3 $\epsilon$ -Gene können ein  $\zeta\zeta$ -Homodimer binden (119), welches, wie auch beim Säuger, ein essenzieller Bestandteil des Hühner-TCR ist. Es ist ein konserviertes Adaptor-Molekül, das sogar mit dem Säuger-TCR assoziieren kann (120).

#### 2.3.2.4 CD4 und CD8 in Säuger und Haushuhn

Mögliche Corezeptoren auf den Oberflächen der  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen sind CD4 und CD8 (121,122). Diese sind beide wichtig für die Funktion der T-Zellen, da sie an der Erkennung der Antigene mitwirken, indem sie an MHC-Moleküle binden und die Wechselwirkung mit anderen Zellen beeinflussen. Dabei erkennen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, MHC-II-Moleküle, die von den meisten Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen) exprimiert werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen MHC-I-Moleküle, die von fast allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden (88,123). Zusätzlich nehmen die Corezeptoren auch an der Signalgebung des TCRs teil, und assoziieren bei der Bindung eines Antigens mit dem TCR.

#### 2.3.2.4.1 CD4-Rezeptor

Der CD4-Corezeptor der Säuger ist ein einzelkettiges Molekül bestehend aus vier Immunglobulin-ähnlichen Domänen, er bindet gleichzeitig mit dem TCR an denselben Peptid:MHC-Komplex. Durch CD4 wird die Empfindlichkeit der Zelle für ihr Antigen erhöht, da dieser Corezeptor mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Lck verbunden ist, die die Aktivierung einer Signalkaskade nach Antigenerkennung unterstützt (67).

Beim Huhn ist der CD4-Corezeptor ebenfalls ein einzelkettiges Molekül mit 4 extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen und einer zytoplasmatischen Domäne mit konservierter Lck-Bindungsstelle (63).

#### 2.3.2.4.2 CD8-Rezeptor

Der CD8-Corezeptor der Säuger ist ein Dimer aus zwei verschiedenen Ketten,  $\alpha$  und  $\beta$ , die über Disulfidbrücken verbunden sind und jeweils eine Immunglobulin-ähnliche Domäne enthalten. Die CD8 $\alpha$ -Ketten können Homodimere bilden, dies kommt aber eher selten vor. Naive T-Zellen weisen CD8 $\alpha$  $\beta$  auf ihrer Oberfläche auf, CD8 $\alpha$  $\alpha$  kann von T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen exprimiert werden (67). Der TCR und CD8 interagieren gleichzeitig mit dem MHC-I-Molekül, dabei steht CD8 über den zytoplasmatischen Schwanz seiner  $\alpha$ -Kette mit der Lck-Kinase in Verbindung und erhöht dadurch die Empfindlichkeit der T-Zellen für das Antigen bis um das 100-fache. Circa 50% der  $\gamma$  $\delta$  T-Zellen in der Milz des Menschen exprimieren CD8 auf ihren Oberflächen, und nur bis zu 30% im Blut (124).

Der CD8-Corezeptor des Huhns ähnelt ebenfalls dem der Säuger, er besteht aus zwei Ketten,  $\alpha$  und  $\beta$ , die  $\alpha\alpha$ - und  $\alpha\beta$ -Dimere bilden (125). Beide Ketten enthalten eine extrazelluläre Vähnliche Immunglobulin-Domäne. CD8 $\alpha$  enthält eine Lck-Bindungsstelle, CD8 $\beta$  besitzt nur eine kurze zytoplasmatische Domäne. Die meisten T-Zellen tragen CD8 $\alpha\beta$  auf ihren Oberflächen, bei jungen Hühnern trägt allerdings eine  $\gamma\delta$  T-Zell-Population CD8 $\alpha\alpha$  auf ihrer Oberfläche, vor allem in Milz und Darm. Im Darm gibt es eine CD8 $\alpha\beta$ -tragende  $\gamma\delta$  T-Zell-Population, die im Säuger nicht gefunden wurde (63). Die meisten Hühnerlinien exprimieren CD4 $^+$  oder CD8 $^+$  T-Zellen in der Peripherie, manche Hühnerlinien zeigen eine Co-Expression von CD4 und CD8 $\alpha\alpha$  auf einem Großteil ihrer peripheren T-Zellen (126).  $\gamma\delta$  T-Zellen tragen im Darm vor allem CD8 auf ihren Oberflächen, ebenso wird es von einem hohen Prozentsatz in der Milz exprimiert, aber man findet es nur zu geringen Teilen im Blut (127,128).

#### 2.3.2.5 TCR-Signaling der Säuger und des Haushuhns

Das TCR-Signaling bei Huhn und Säuger läuft vermutlich ähnlich ab. Das Signal wird durch 10 zytoplasmatische ITAMs verstärkt, die in den zytoplasmatischen Domänen der verschiedenen CD3-Ketten und des ζζ-Homodimers liegen. Eine erste Reaktion erfolgt nach Bindung des Liganden, und zwar durch die Lck-Kinase (129,130). Sie wird über ihre Bindung an den CD4-bzw. den CD8-Corezeptor in die Nähe der ITAMs gebracht, und führt schließlich zu ihrer Phosphorylierung. Die phosphorylierten ITAMs binden dann an die Tyrosinkinase ZAP-70, welche daraufhin ebenfalls durch Lck phosphoryliert wird, was zu einer erhöhten katalytischen Aktivität führt (63,131).

Im Gegensatz zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen, deren Funktionen und Effektormechanismen in vielen Spezies charakterisiert wurden (89,132-134), ist die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen noch nicht so genau bekannt. Auf den aktuellen Stand wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

#### 2.4 γδ T-Zellen beim Säuger

#### 2.4.1 Entwicklung der γδ T-Zellen

Die Entwicklung der  $\gamma\delta$  T-Zellen findet während der Embryonalentwicklung und in der frühen Neonatalphase im Thymus statt, sie wurde vor allem in Mäusen erforscht (135,136). Die T-Zell-Vorläufer befinden sich bei jungen Säugern im Stroma des Thymus (67).

γδ T-Zellen sind die ersten T-Zellen, die sich im Thymus, noch vor den  $\alpha\beta$  T-Zellen, aus ihrem gemeinsamen CD4- und CD8-doppeltnegativen Vorläufer entwickeln (137,138). Sie verlassen den Thymus in Wellen, welche mit bestimmten Vγ-Segmenten zusammenhängen, zum Teil einen invarianten TCR besitzen, und in bestimmte Gewebe wandern (139-144). γδ T-Zellen bleiben zum größten Teil CD4-CD8- und durchlaufen kein, nicht wie  $\alpha\beta$  T-Zellen, doppeltpositives Stadium, aus dem letztere CD4+ oder CD8+ herauskommen (137,145,146).

Im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Wirbeltieren, bei denen sich unreife T-Zellen im Thymus entwickeln, erlangen  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus zum Teil schon dort ihre Funktionen, wie die Produktion von IFN- $\gamma$  oder IL-17 (143,147),  $\alpha\beta$  T-Zellen hingegen verlassen den Thymus in naiver Form. Der Teil der  $\gamma\delta$  T-Zellen, der schon während der Entwicklung im Thymus seine Funktion erhält, kann eher der angeborenen Immunantwort zugeteilt werden (148,149).

An Embryonaltag ET 13 wird der fetale Thymus von fetalen Leber-Vorläufern besiedelt und generiert schließlich die  $\gamma\delta$  T-Zell-Wellen.

Als erstes verlassen  $V\gamma 5V\delta 1^+$  DETCs (dendritic epidermal  $\gamma \delta$  T cells) nach ET 13 bis ungefähr ET 17 den Thymus und wandern in die Epidermis. Dies scheint abhängig von Skint-1 zu sein, einem Protein mit Immunglobulin-ähnlicher Domäne (150-153).

 $V\gamma6V\delta1^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen siedeln sich in mucosalen Epithelien verschiedener Organe an, wie weiblichem Reproduktionstrakt, Dermis, Zunge und Lunge, nachdem sie den Thymus als 2. Welle ab ET 14 bis zum Zeitpunkt um die Geburt herum verlassen haben (154). Sie gehören zu den IL-17-bildenden  $T_{\gamma\delta}$ -17-Zellen (155).

 $V\gamma 1^+$  und  $V\gamma 4^+$  T-Zellen, gepaart mit verschiedenen Vδ-Genen, dadurch weniger invariant, verlassen den Thymus dann ab ET 16. Beide gehören ebenfalls zu den  $T_{\gamma\delta}$ -17-Zellen (143,156,157), und können sich nicht nur fetal, sondern auch neonatal oder adult entwickeln. Die  $V\gamma 4^+$  Zellen wandern in Dermis, Darmepithel und alle lymphatischen Organe (140,154).

Prinz et al. (143) teilte die  $\gamma\delta$  T-Zell-Entwicklung der Mäuse zusätzlich in funktionelle Wellen ein. Als erstes entstehen die DETCs, dann die  $T_{\gamma\delta}$ -17-Zellen und in der letzten Welle schließlich die  $\gamma\delta$  NKT-Zellen (158,159).

Vγ7<sup>+</sup> T-Zellen, die sich im Dünndarmepithel aufhalten, werden erst später außerhalb des Thymus gebildet (160).

Auch beim Menschen sind  $\gamma\delta$  T-Zellen die ersten funktionalen T-Zellen in der Peripherie (143,161). Sanchez et al. (144) vermuteten aufgrund verschiedener Beobachtungen auch hier die  $\gamma\delta$  T-Zellentwicklung in Wellen. Die bisher bekannte erste prä-thymische  $\gamma\delta$  T-Zell-Welle wird in der 5.-6. Schwangerschaftswoche (SSW) von den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen, die einen semi-invarianten TCR tragen, in der fetalen Leber bestimmt (162).

Über ihre thymale Entwicklung ist noch nicht viel bekannt, Studien von 1990 und 1991 fanden die ersten  $\gamma\delta$  T-Zellen im Thymus in der 10.-11. SSW (163,164), auch eine aktuelle Studie von 2020 fand  $\gamma\delta$  T-Zellen im Thymus um diesen Zeitraum (165).

Zwischen der 8. und 22. SSW fand man eine Welle V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen im fetalen Thymus. Ebenso gibt es eine fetale thymale V $\delta$ 1<sup>+</sup> T-Zell-Welle, so wie eine postnatale Welle (144).

Von den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen wurde auch nach der Geburt eine thymale Welle entdeckt (166). Ähnlich der Maus scheinen sich auch bei manchen  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen schon im fetalen Thymus Effektorfunktionen zu entwickeln. Es gibt drei Cluster, die den drei Typen der Immunität entsprechen. Die erste Welle trägt  $\gamma\delta$  T-Zellen zugehörig zu Typ 3, die IL-17 produzieren. Die zweite Welle trägt  $\gamma\delta$  T-Zellen von Typ 1 und Typ 2, und findet in der Mitte der Schwangerschaft statt (144).

Beim Schwein und beim Schaf finden sich die ersten thymalen  $\gamma\delta$  T-Zellen schon sehr früh, es gibt bereits vor der Geburt ein diverses Repertoire (167-169).

#### 2.4.2 Vorkommen der γδ T-Zellen

Bisher konnten  $\gamma\delta$  T-Zellen in allen untersuchten Säugern entdeckt werden (138,170). Säuger können bezüglich ihrer Frequenz an peripheren  $\gamma\delta$  T-Zellen in zwei Gruppen eingeteilt werden: die mit einem hohen Anteil, über 10%, und die mit einem geringen Anteil, unter 10%, dieser Zellen an den peripheren T-Zellen im Blut. Mensch, Maus, Ratte und Hund gehören zu den Spezies mit geringem Anteil (9-11). Schwein (171), Rind, Schaf (172,173), Ziege (174), und Hase (175) gehören zu den Spezies mit hohem Anteil.

Bei Mensch und Maus nehmen die peripheren  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut 0,5 bis 10% ein (138), beim Hund 2,5% (176). Bei Schweinen nehmen sie in jungen Tieren bis zu 30% ein, zwischen 4 und 12 Monaten erreichen sie bis zu 50%, danach sinken sie wieder (177,178). Beim Rind sind 20-40% (172), bei der Ziege 5-20% (174,179), beim Schaf 30-60% (173) und beim Hasen bis zu 20% (175)  $\gamma\delta$  T-Zellen anteilig im Blut. Ähnlich dem Schwein verändert sich die  $\gamma\delta$  T-Zell-Frequenz beim Schaf altersabhängig, sie ist direkt nach der Geburt sehr hoch, bei bis zu 60%, und sinkt dann im Lauf der Zeit bis auf 5-10% ab (180). Auch die Frequenz bei Ziegen verändert sich mit dem Alter (174).

 $\alpha\beta$  T-Zellen wandern aus dem Thymus in Lymphknoten und Milz, genauer die T-Zellzonen der weißen Pulpa. Ein Teil der  $\gamma\delta$  T-Zellen wandert ebenfalls in Lymphknoten, die meisten sammeln sich aber direkt in mucosalen Geweben, in Barrieregeweben, und in vielen nichtlymphoiden Geweben (123), vor allem in Epithelien wie im Intestinum. Sie tragen dazu bei, die Gewebe-Homöostase aufrechtzuerhalten (181).  $\gamma\delta$  T-Zellen kann man in der Milz nicht nur in der weißen Pulpa finden, sondern auch in der roten Pulpa (124).

Der Großteil der residenten  $\gamma\delta$  T-Zellen entsteht in der späteren Embryonalphase und der frühen Neonatalphase. Sie bestehen aus V $\gamma$ 1- und V $\delta$ 6-Ketten und bilden zwei Gruppen, die sich in ihrer Zytokinproduktion und ihrem Vorkommen unterscheiden. Die erste Gruppe bildet IFN- $\gamma$  und IL-4, sie befindet sich in der Leber und verschiedenen lymphatischen Organen. Die zweite Gruppe bildet nur IFN- $\gamma$ , sie befindet sich in allen lymphatischen Organen (67).

Beim Menschen besteht die Hauptpopulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut aus den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Zellen, die Zahl dieser variiert zwischen Individuen, verschiedene Faktoren wie Alter und Geschlecht beeinflussen ihr Vorkommen (182).

Fetale  $\gamma\delta$  T-Zellen befinden sich vor allem in Leber, Intestinum und Blut (144). In der fetalen Haut des Menschen scheint es nur einen geringen Teil von  $\gamma\delta$  T-Zellen zu geben, aber dafür T-Zellen, die sowohl den  $\alpha\beta$  TCR als auch den  $\gamma\delta$  TCR auf der Oberfläche tragen (183).

Bei der Maus wandern  $\gamma\delta$  T-Zellen mit zum Teil invarianten TCRs in bestimmte Gewebe. Wie  $V\gamma5^+$  DETCs in die Epidermis, oder  $T_{\gamma\delta}$ -17-Zellen in Leber, Dermis, Cornea, ZNS, Lymphknoten, Zunge und Reproduktionstrakt (143). Sie nehmen in der Haut 50-70% der T-Zellen ein, und im Reproduktionstrakt 10-20% (154).

Beim Schwein kommen CD2 $^{-}$   $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem in Blut und Leber vor, CD2 $^{+}$   $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem in Milz und Thymus (184).

Beim Rind kann man einige  $\gamma\delta$  T-Zellen in Lymphknoten, Haut- und Darmepithel finden (172), auch beim Schaf kommen sie gehäuft in Haut und Darm vor (180).

#### 2.4.3 Funktionen der γδ T-Zellen

 $\gamma\delta$  T-Zellen besitzen neben den adaptiven Eigenschaften auch angeborene (185-188). Es gibt zum einen die  $\gamma\delta$  T-Zellen, die in lymphales Gewebe wandern und dort nach Antigenkontakt klonal expandieren, somit also dem adaptiven Immunsystem angehören. Zum anderen aber gibt es auch solche, die direkt ins Gewebe wandern und aufgrund eines invarianten TCRs, den mehrere  $\gamma\delta$  T-Zellen tragen, schnell und in größerer Zahl auf das Antigen reagieren können, was dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen ist. Intraepitheliale  $\gamma\delta$  T-Zellen erkennen Moleküle, die in Folge einer Infektion entstanden sind und nicht Bestandteile des Pathogens selbst, auch diese Gegebenheit macht sie dem angeborenen Immunsystem zugehörig, und wird als transitionale Immunität bezeichnet (67), beispielsweise reagieren sie auf unlösliche Faktoren wie IL-12 und TNF- $\alpha$ , beide werden von Phagozyten als Reaktion auf Mykobakterien gebildet (189).

Allgemein spielen  $\gamma\delta$  T-Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorüberwachung (190), dem Schutz vor intra- und extrazellulären Pathogenen, der Modulation angeborener und adaptiver Immunantworten, Gewebeheilung und Erhaltung der Epithelzellen durch KGF1, KGF2 und EGF1 (191,192). Diese Rolle der  $\gamma\delta$  T-Zellen in vielen physiopathologischen Prozessen beruht auf der Kombination von Antigen-Spezifität, Gewebeverteilung und funktionellen Eigenschaften (123).

 $\gamma\delta$  T-Zellen sind nicht darauf beschränkt, nur Peptide zu erkennen, die von MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentiert werden, wie die  $\alpha\beta$  T-Zellen, sondern können auch direkt lösliche Antigene und nicht-Peptid-Antigene erkennen, wie z.B. Glykoproteine oder Lipid-Antigene der Mykobakterien. Die menschlichen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen beispielsweise werden durch Phosphoantigene aktiviert (193,194), dabei sind sie sensibler für die von Mikroorganismen produzierten Phosphoantigene als für die vom Körper selbst produzierten, wodurch eine Reaktion auf körpereigene Zellen verhindert wird (123).

Ähnlich wie NK-Zell-Rezeptoren erkennen  $\gamma\delta$  T-Zellen auch durch Stress oder Zellschäden induzierte Liganden, wie ULBP4 oder EPCR (67). Dies führt zu verschiedenen Effektorfunktionen, wie der Beseitigung von Pathogenen, Inflammation, oder Regulation der Gewebe-Homöostase (195). Sie reagieren auf die Stimulation mit PAMPs und produzieren Zytokine (196), wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  gegen Viren und intrazelluläre Pathogene, IL-17 gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze, IL-4, IL-5 und IL-13 gegen extrazelluläre Parasiten, oder GM-CSF (184,197,198). Sie können aber auch immunsuppressive Zytokine, TGF- $\beta$  und IL-10, produzieren (199).

Durch NKG2D-Rezeptoren können  $\gamma\delta$  T-Zellen auf Tumorzellen und infizierte Zellen reagieren (200). Sie töten infizierte, transformierte oder aktivierte Zellen (201,202), und tragen durch die Produktion von Defensinen entweder direkt zur Pathogenbeseitigung bei (202), oder indirekt durch die Aktivierung anderer Effektorzellen (203). Weitläufig können  $\gamma\delta$  T-Zellen in zwei Gruppen eingeteilt werden, IL-17A-produzierend oder IFN- $\gamma$ -produzierend, wobei die jeweilige Entstehung vermutlich im Thymus festgelegt wird, abhängig von der Stärke der Bindung des Liganden (204). Die IL-17A-Produktion reguliert unter anderem die Thermogenese (205) und die Knochenregeneration (206).

Weitere bekannte Liganden sind Antigene, die von nicht-klassischen MHC-Ib-Molekülen präsentiert werden, wie z.B. T22, oder Hitzeschockproteine.

Zusätzlich bei der Maus bekannte Liganden sind Phycoerythrin aus Algen und Cardiolipin aus der inneren Mitochondrienmembran (67).

In vitro-Studien haben gezeigt, dass γδ T-Zellen zum Teil auch zytotoxische Effektorfunktionen ausführen (207), und dass sie B-Zellen Antigene präsentieren können (208). Funktionelle Unterschiede werden bei der Maus von bestimmten Vγ-Regionen, beim Menschen von bestimmten Vδ-Regionen bestimmt, und sind meist in bestimmten Geweben dominant. Vδ2+ Zellen des Menschen sind zytotoxisch, sie produzieren IFN-γ und TNF. Die Vδ1+ Zellen sind weniger zytotoxisch, sie produzieren mehr Zytokine, wie IL-4 und IL-17 (209).

Die Vy5<sup>+</sup> DETCs der Mäuse reagieren vor allem auf Verletzungen und Infektionen, sie üben zytoprotektive, immunmodulatorische und antibakterielle Funktionen aus (67), und setzen bestimmte Chemokine, welche andere Leukozyten rekrutieren, frei, und Zytokine wie IL-13, mit dem das B-Zell-Wachstum reguliert werden kann (188). Durch ihre geringe Diversität und ihren invarianten Rezeptor, erkennen sie nur ein Antigen oder zumindest nur wenige verschiedene Antigene, wodurch dann bei Präsenz dieses Antigens direkt mehrere y $\delta$  T-Zellen reagieren können, ohne vorherige klonale Expansion (210). Die Vy6<sup>+</sup> y $\delta$  T-Zellen der Mäuse in den mucosalen Epithelien produzieren nach ihrer Stimulation IL-17, vor allem bei Lungeninfekten (211), die Vy7<sup>+</sup> T-Zellen produzieren IFN-y, die Vy1<sup>+</sup> Zellen in der Leber IL-4 und IFN-y (212). Die y $\delta$  T-Zellen junger Mäuse erzeugen eine protektive Immunität, bisher gibt es aber keinen Nachweis über die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (213).

γδ T-Zellen scheinen eine Funktion in einigen Infektionen zu haben, zumindest proliferieren sie bei Mensch und Maus nach Aktivierung mit *Plasmodium falciparum* (214), Tuberkulose (215), Lepra (216), Herpesviren (217,218), Cytomegalovirus (CMV) (219), oder Hepatitis B (220). Bei der Maus schützen sie sich durch Produktion von IFN- $\gamma$  vor einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* (221), und zeigen eine inflammatorische Reaktion in der Lunge nach Infektion mit Influenza A Virus (222). Auch produzieren die Mäuse- $\gamma$ δ T-Zellen unterschiedliche Zytokine, abhängig von der Art der Infektion (223), nämlich IFN- $\gamma$  nach Infektion mit intrazellulären Bakterien, oder IL-4 nach Infektion mit einem extrazellulären Parasiten.

Beim Rind sieht man ebenfalls einen solchen Anstieg der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut nach Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ I (224).

 $V\gamma9V\delta2^+$  Zellen des Menschen haben vermutlich eine wichtige Funktion im Alter inne, da sie nicht anfällig sind für Seneszenz (225). Vor allem aber sind  $\gamma\delta$  T-Zellen wichtig in der frühen Immunität (226). Es wurde ein Mitwirken am Schutz vor *Clostridium difficile* in Kindern durch IL-17A produzierende  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen (227), sowie eine *in utero* Antwort von  $\gamma\delta$  T-Zellen auf mikrobielle Angriffe.  $V\gamma9V\delta2^+$  T-Zellen zeigen beispielsweise eine erhöhte Zytotoxizität bei kongenitaler Toxoplasmose-Infektion (228), nicht- $V\gamma9V\delta2$  T-Zellen reagieren auf kongenitale CMV-Infektionen (229). Eventuell sind  $\gamma\delta$  T-Zellen auch wichtig für die Antikörper-Produktion während des ersten Trimesters einer Schwangerschaft, indem sie B-Zellen unterstützen, sich zu Plasmazellen zu differenzieren (230).

Eine weitere wichtige Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen ist das Mitwirken an der Erzeugung des richtigen Milieus für die Aktivierung einer T<sub>H</sub>1-Antwort (217). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Zellen können Antigene

an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren (208), und können über die Produktion von CXCL13 die Organisation von B-Zellen in Lymphfollikeln regulieren (231).

 $\gamma\delta$  T-Zellen scheinen auch bei Autoimmunerkrankungen durch Produktion von IL-17 und IFN- $\gamma$  eine Rolle zu spielen (123).

Aktuell gibt es Studien an  $\gamma\delta$  T-Zellen als Targetzellen in der Krebstherapie, da ihre MHC-unabhängige Aktivierung gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen Vorteile bietet (232,233).

#### 2.4.4 *In vitro*-Verhalten von γδ T-Zellen

Ein selektives Wachstum von  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde schon in verschiedenen Stimulationsprotokollen von Menschen, Mäusen, und Schweinen gezeigt.

Durch Bestandteile des Erregers *Plasmodium falciparum* proliferieren humane  $\gamma\delta$  T-Zellen (214). Dabei wird eine bestimmte  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation, die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> Zellen, im Blut stimuliert. Diese Subpopulation kann auch, nach vorheriger Aktivierung mit IL-2 und Zoledronsäure, mit IL-12 und IL-18 stimuliert werden (234), und durch die Kombination aus HMBPP mit IL-2 oder IL-12 (197).

Bei Mäusen können  $\gamma\delta$  T-Zellen durch hohe Dosen Ionomycin stimuliert werden (235), und reagieren auf eine Kombination aus IL-2 und IL-7, IL-2 und IL-1, oder eine Kombination aus TCR-Crosslinking und einem Zytokin (236).

 $\gamma\delta$  T-Zellen aus Schweineblut können durch eine Kombination von ConcanavalinA (ConA) mit verschiedenen Zytokinen, wie IL-2, IL-12 oder IL-18, proliferieren (237), oder durch Ionomycin zusammen mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) (184).

Die häufig zur Stimulation von NK-Zellen (238-240) eingesetzte Kombination aus IL-2 und IL-12 führt auch bei humanen  $y\delta$  T-Zellen aus dem Blut zur Proliferation (189).

Mehrere Studien beobachteten, dass die Zugabe von IL-2 zu mit IL-12 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen dessen proliferierenden Effekt verstärkt (189,241). Auch IL-2 alleine hat eine stimulierende Wirkung auf  $\gamma\delta$  T-Zellen (242).

 $\gamma\delta$  T-Zellen zeigen bezüglich Infektionen eine Abhängigkeit von  $\alpha\beta$  T-Zellen, wie nach Malaria-Infektion (243), oder bei Tuberkulose (215).

Humane  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigen nach Stimulation mit IL-12 eine Hochregulation des IL-2R und reagieren daraufhin besser auf die Zugabe von IL-2 (189).

Die Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Maus mit IL-2 und ConA führt, zusätzlich zur Proliferation, auch zur Expression von CD8 auf einem Teil der Zellen (244), so auch eine Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 (245). Es ist bekannt, dass die Stimulation mit IL-2, ähnlich dem Huhn, zur Expansion aktivierter CD8<sup>+</sup> Zellen führt (246). CD8 ist ein Corezeptor des TCR, wichtig für Antigenerkennung (122) und T-Zellaktivierung (129,130), er wird beim Menschen von ca. 50% der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz, und nur von bis zu 30% dieser Zellen im Blut exprimiert (124). Bei der Ratte exprimieren bis zu 85% der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz CD8 (88).

Das häufig eingesetzte IL-2 ist ein Wachstumsfaktor, produziert von T-Zellen, das der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen dient. Sein Rezeptor ist aufgebaut aus der IL- $2R\alpha$ - (CD25), der IL- $2R\beta$ - (CD122) und der IL- $2R\gamma$ c-Kette (CD132) (247). Ein IL-2-Knockout zeigt eine deregulierte T-Zell-Proliferation.

Das IL-12, der NK cell stimulatory factor, ist ein Heterodimer aus IL-12 $\beta$ , p40, und IL-12 $\alpha$ , p35. Sein Rezeptor besteht aus IL-12R $\beta$ 1- und IL-12R $\beta$ 2-Ketten. Produziert wird IL-12 von Makrophagen und dendritischen Zellen und dient der Aktivierung von NK-Zellen und der Induktion der Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-ähnlichen Zellen. Ein Knockout von IL-12 führt zu einer gestörten IFN- $\gamma$ -Produktion und gestörten T<sub>H</sub>1-Reaktionen (67,248).

Unter anderem mit IL-2 und IL-12 stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen des Schweins produzieren in Zellkultur IFN- $\gamma$ , durch zusätzliche Gabe von IL-18 wurde diese Produktion erhöht (237). Auch die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Rindes produzieren infolge einer Stimulation mit IL-12 und IL-18 IFN- $\gamma$  (249). Dies konnte auch bei Mäusen beobachtet werden, das produzierte IFN- $\gamma$  schützte anschließend vor einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* (221). Eine IFN- $\gamma$ -Produktion durch humane  $\gamma\delta$  T-Zellen kann durch IL-12, auch zusammen mit IL-2, erreicht werden (198,250). Humane  $\gamma\delta$  T-Zellen produzieren in Kultur nicht nur IFN- $\gamma$ , sondern auch TNF- $\alpha$  und IL-17, ebenfalls durch Stimulation mit IL-2, IL-12 und IL-18 (251), nach HMBPP- und IL-12-Stimulation konnten IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF nachgewiesen werden (197).

#### 2.5 γδ T-Zellen beim Huhn

#### 2.5.1 Entwicklung der γδ T-Zellen

Die Entwicklung der  $\gamma\delta$  T-Zellen beim Huhn ist strikt Thymus-abhängig (252) und unterscheidet sich in vielen Aspekten von der  $\alpha\beta$  T-Zell-Entwicklung.

Die Besiedlung des Thymus durch T-Zellvorläufer läuft in drei Wellen ab, die an den Embryonaltagen ET 6, ET 12 und ET 18 bis kurz nach Schlupf auftreten (253,254). Die erste Welle kommt aus der para-aortalen Region (255), die zweite und dritte kommen aus dem Knochenmark (256). Jede dieser Wellen ist mit einem T-Zellvorläufer-Peak im Blut gekoppelt (257). An ET 12 beginnen die T-Zellen TdT zu exprimieren. Aufgrund dessen kann es als früher T-Zellmarker genutzt werden (258,259). Die Vγ-Gene fangen an ET 10 an, sich zu rearrangieren (104).

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen erscheinen drei Tage vor den  $\alpha\beta$  T-Zellen in jeder Welle, an ET 12 exprimieren die ersten T-Zellen den  $\gamma\delta$  TCR-CD3-Komplex auf ihrer Oberfläche (8). Ihren Peak erreichen sie mit 30% zwischen ET 12 und ET 15 (260).

 $\alpha\beta$  T-Zellen, die V $\beta$ 1 exprimieren, erscheinen an ET 15 und stellen an ET 17-18 die dominierenden Thymozyten dar (128).  $\alpha\beta$  T-Zellen, die V $\beta$ 2 exprimieren erscheinen an ET 18 (261).

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen der 1. und 3. Welle tragen V $\gamma$ 1-, V $\gamma$ 2-, und V $\gamma$ 3-Gene gleichermaßen, die der 2. Welle vor allem V $\gamma$ 2-Gene, V $\gamma$ 1 und V $\gamma$ 3 kommen nur in geringer Zahl vor (253).

Im Gegensatz zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigen  $\alpha\beta$  T-Zellen, ähnlich dem Säuger, eine Doppelexpression von CD4 und CD8 auf ihren Oberflächen, die dann nach klonaler Selektion und Reifung im Cortex des Thymus zu CD4- oder CD8-einzelpositiven T-Zellen werden (262).

Der T-Zellexport aus dem Thymus erfolgt ebenfalls in drei Wellen (253). Jede Welle beginnt mit dem Export von  $\gamma\delta$  T-Zellen, gefolgt von V $\beta$ 1- und V $\beta$ 2- $\alpha\beta$  T-Zellen, jeweils 2-3 Tage später. Während der 1. Welle werden an ET 15-17  $\gamma\delta$  T-Zellen in die Peripherie exportiert, an ET 18-20  $\alpha\beta$  T-Zellen. Während der 2. Welle werden  $\gamma\delta$  T-Zellen um die Zeit des Schlupfes,  $\alpha\beta$  T-Zellen 2-4 Tage nach Schlupf exportiert, und während der 3. Welle werden  $\gamma\delta$  T-Zellen dann 6-8 Tage nach Schlupf und  $\alpha\beta$  T-Zellen ca. 2 Tage später exportiert.

 $\gamma\delta$  T-Zellen gelangen an ET 15 in die Milz, V $\beta$ 1- $\alpha\beta$  T-Zellen an ET 19 und 2 Tage nach Schlupf V $\beta$ 2- $\alpha\beta$  T-Zellen (263). Die T-Zellen zeigen verschiedene Homing-Muster in der Milz,  $\gamma\delta$  T-Zellen wandern in sinusoidale Areale der roten Pulpa, V $\beta$ 1- und V $\beta$ 2- $\alpha\beta$  T-Zellen in periarterioläre lymphatische Scheiden. Ab ET 15 findet man  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht nur in der Milz, sondern auch im intestinalen Epithel (2).

Identifizieren kann man die verschiedenen T-Zellen durch eine Färbung ihrer TCRs mit monoklonalen Antikörpern. TCR1 färbt  $\gamma\delta$  T-Zellen an, TCR2 und TCR3 färben V $\beta$ 1- und V $\beta$ 2-  $\alpha\beta$  T-Zellen an (3,8,128,264-267), zu den eher selten vorkommenden V $\beta$ 3- $\alpha\beta$  T-Zellen ist jedoch noch nicht viel bekannt (105).

#### 2.5.2 Vorkommen der γδ T-Zellen

Entdeckt wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Haushuhns erstmals von Sowder et al. (8).

Hühner gehören zu den Spezies mit einem hohen Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den peripheren T-Zellen im Blut, nämlich 15 bis 50% der zirkulierenden T-Lymphozyten im Hühnerblut sind  $\gamma\delta$  T-Zellen. Eine große  $\gamma\delta$  T-Zell-Population befindet sich auch in verschiedenen Geweben,

einschließlich Intestinum und Milz, hier vor allem in der roten Pulpa (127,268). Es sind die ersten Zellen, die im Hühnerthymus während der Embryonalentwicklung entstehen. 10% der Thymozyten, 15% der zirkulierenden T-Zellen, und 25% der Milzzellen in adulten Tieren sind  $\gamma\delta$  T-Zellen (8,121).

Untersuchungen zum TCR $\gamma$  ergaben eine hohe Expression in Thymus und Milz, und eine eher niedrige Frequenz in Lunge und Darm in 30 Tage alten Tieren. Bei ca. einem Jahr alten Tieren wird der TCR $\gamma$  weiterhin häufig in Thymus und Milz exprimiert, und auch vermehrt in Lunge und Darm (13). Im Darm findet man  $\gamma\delta$  T-Zellen vor allem im Epithel, wie auch beim Säuger, in der Haut konnten bisher aber keine  $\gamma\delta$  T-Zellen gefunden werden (268).

Die  $\gamma\delta$  T-Zell-Frequenz wird von Geschlecht und Alter der Tiere beeinflusst. Männliche Hühner zeigen eine Androgen-induzierte Expansion der Zellen im peripheren Blut und der Milz im Alter von 4-6 Monaten (269). Legehennen im Alter zwischen 16 und 20 Wochen weisen eine generalisierte Suppression von unter anderem  $\gamma\delta$  T-Zellen in Milz, Ovar, Infundibulum und Magnum auf (270).

#### 2.5.3 Funktionen der γδ T-Zellen

Trotz der hohen Frequenz an  $\gamma\delta$  T-Zellen im Haushuhn ist bisher nicht viel über ihre Funktion bekannt.

Im Huhn weiß man nicht, ob  $\gamma\delta$  T-Zellen klassische Peptid:MHC-Komplexe erkennen oder, wie im Säuger, zusätzlich alternative Liganden haben. Sie scheinen aber auch durch Hitzeschockproteine aktiviert werden zu können (271).

Durch ihre Expression von TLR können Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen zur "First line of defense" gezählt werden (272).

Ihre Funktion wurde in ein paar für Hühner und auch Menschen relevanten Infektionen untersucht, wie MDV-, Salmonella- und Eimeria-Infektionen.

MDV-vakzinierte Hühner zeigen eine hohe zytotoxische Aktivität ihrer  $\gamma\delta$  T-Zellen *ex vivo* (273), auch ihre Frequenz steigt nach MDV-Infektion (274), und Küken infiziert mit *Salmonella typhimurium* zeigen eine Expansion bestimmter  $\gamma\delta$  T-Zell-Subgruppen, nämlich von CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen, in Blut und anderen Organen (275,276).  $\gamma\delta$  T-Zellen entwickeln einen protektiven Effekt gegen Eimeria-Infektionen (213,277), dies ist vor allem wichtig bei den anfälligeren jungen Tieren. Die Zahl der  $\gamma\delta$ -IELs ist bei Infektionen erhöht, deren Rolle wurde aber bisher nicht geklärt (278). Bei der Initiation einer protektiven Antwort auf eine systemische und gastrointestinale *Salmonella Enteritidis*-Infektion spielen  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Schlüsselrolle (275).

γδ T-Zellen aus dem Darm produzieren *in vitro* Zytokine, und zeigen zytotoxische Aktivität (279), sie könnten auch immunregulatorische Fähigkeiten besitzen (280).

Allgemein produzieren  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Vielzahl an Zytokinen, wie IL-10 und IFN- $\gamma$  (274) und können zytotoxische Effektorfunktionen ausüben (281). Auch reagieren sie auf Infektionen (282) oder auf Änderungen im Hormonspiegel (269). IFN- $\gamma$  produzieren sie beispielsweise als Reaktion auf MDV (274,283) oder Salmonellen (284), vermutlich als inflammatorische Antwort auf die frühe Phase der Infektion. Bei MDV-Infektion produzieren sie auch TGF- $\beta$  (273), im weiteren Verlauf der Infektion zusätzlich IL-10, dieses dient hier aber wahrscheinlich zur Rekrutierung CD8<sup>+</sup> Zellen zum Infektionsherd, und wirkt nicht immunsuppressiv (285,286). Laursen et al. (274) beobachteten bei hoher IL-10-Produktion ebenso eine hohe CD8-

Expression. CD8 $^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen sind essenziell für die Beseitigung von Pathogenen durch Töten infizierter Zellen (276).

Die CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigen nach der Infektion mit Salmonellen zwar die IFN- $\gamma$ -Expression, aber keine IL-4-Expression, was der erwarteten T<sub>H</sub>1-Antwort entspricht (287).

Vermutlich können  $\gamma\delta$  T-Zellen aufgrund der verschiedenen Zytokin-Expressionen die Differenzierung der CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen beeinflussen (288). Eine weitere Funktion ist ihre Mitwirkung an Graft versus Host-Reaktionen (289).

#### 2.5.4 *In vitro*-Verhalten von γδ T-Zellen

Für die Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Haushuhn wurden bisher verschiedene Methoden angewandt, unter anderem der Einsatz von Zytokinen.

Zytokine sind regulatorische Peptide, sie fungieren als extrazelluläre Signale zwischen Zellen, werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert, meist als Antwort auf einen Stimulus, und binden an spezifische Zelloberflächenrezeptoren, die dann die Signaltransduktion in den Zielzellen auslösen. Die Interleukine haben funktionelle Aktivitäten, auch bezüglich Lymphozyten. Ein T-Zell-proliferatives Interleukin des Huhns ist z.B. das IL-2 (63). Es hat ähnliche Eigenschaften wie das Säuger-IL-2 und wird unter anderem von aktivierten T-Zellen, vor allem von T-Helferzellen, produziert (290). Es ist wichtig für die Differenzierung und Proliferation von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. Der IL-2-Rezeptor besteht aus 3 Untereinheiten, der IL-2R $\alpha$ -Kette (CD25), der IL-2R $\beta$ -Kette (CD122), und der IL-2R $\gamma$ -Kette (CD132). CD25 wird auf der Oberfläche von Makrophagen, Thrombozyten, CD4 $^+$  und CD8 $^+$  T-Zellen exprimiert (247).

Hühner-IL12 besteht aus ChIL-12 $\alpha$  (p35) und ChIL-12 $\beta$  (p40). Sein Rezeptor besteht aus 2 Ketten, der IL-12R $\beta$ 1- und der IL-12R $\beta$ 2-Kette (291).

Erste Studien nutzten eine Kombination aus ConA oder anti-CD3 und löslichen exogenen Wachstumsfaktoren, wie IL-2, zur  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation (127). Durch diese konnte gezeigt werden, dass Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen in Kultur durch eine Kombination aus Rezeptorligation und Zytokinen stimuliert werden können. Sie können also nicht von alleine proliferieren, sondern benötigen die Hilfe anderer Zellen, wie z.B. der  $\alpha\beta$  T-Zellen. Die reagierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimieren CD8 auf ihren Oberflächen, in einer späteren Studie wurde dann auch gezeigt, dass IL-2 vor allem die Proliferation von CD8+ Zellen fördert (292). CD8 ist ein Corezeptor des TCR,  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Hühnermilz zeigen eine hohe CD8-Expression, deutlich mehr als die im Blut (127). Aufgrund der verschiedenen Beobachtungen bezüglich  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation und CD8 wird vermutet, dass hauptsächlich die CD8+  $\gamma\delta$  T-Zellen stimuliert werden können (127,284).

Andere Studien zeigten, dass, wie beim Säuger, neben der dualen Stimulation durch TCR-Crosslinking plus Zytokine auch eine Kombination aus zwei Zytokinen für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation ausreicht. Sie nutzten eine Kombination aus IL-2 und IL-12 für verschiedene Untersuchungen an diesen Zellen aus der Milz, wie Zytotoxizitätsassays (281), Tests eines monoklonalen CD48-Antikörpers (293), oder der Charakterisierung von OX40 und OX40L (294).

Zur Stimulation wurde ebenfalls eine Kombination aus ConA und IL-2 genutzt (282), für  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut eine Kombination aus PMA und IL-2 (295).

Wie auch beim Säuger konnte beim Huhn beobachtet werden, dass die Kombination der beiden Zytokine, IL-2 und IL-12, einen verstärkenden Effekt auf  $\gamma\delta$  T-Zellen bzw. auf das Ausüben ihrer Zytotoxizität hat, als es jeweils alleine hätte (281).

Bei der Kultivierung zusammen mit  $\alpha\beta$  T-Zellen konnte bei bestimmten Stimulationen beobachtet werden, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen letztere überwuchern (127).

Man weiß, dass beim Huhn durch IL-12 und IL-18  $T_H$ 1-Antworten aktiviert werden, sie bestimmen somit die T-Zell-Effektorfunktion (296). Bei Abwesenheit von IL-12 wird von T-Zellen deutlich weniger IFN- $\gamma$  produziert (297).

Primäre Milzzellen des Huhns produzieren in Kultur nach Stimulation mit IL-18 IFN- $\gamma$  (298), das Verhalten der  $\gamma\delta$  T-Zellen unter Einfluss verschiedener Zytokine muss aber noch ausführlich untersucht werden. Andere Stimulationen, wie mit dem TCR1-mAK (283), oder Infektionen, wie mit MDV (274,283) oder mit *Salmonella Typhimurium* (284), führen durchaus zur IFN- $\gamma$ -Produktion. Auch die Produktion von IL-10 (274) und IL-17A nach Stimulation mit PMA und Ionomycin wurde beobachtet (299).

#### 2.6 Repertoireanalysen des T-Zellrezeptors

Die vollständige Entschlüsselung verschiedener Säugergenome, wie von Mensch und Maus, und schließlich auch die des Hühnergenoms (55) und später des Huxu-Hühnergenoms (14) hat viele Möglichkeiten eröffnet. T-Zellrezeptor-Repertoireanalysen können zur Erforschung der  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen genutzt werden, wofür die TCR-Loci annotiert werden mussten. Auch die Erstellung von CDR3-Profilen anhand ihrer Länge, ermittelt mithilfe von CDR3-Spektratypisierung oder durch Sequenzierung, tragen zur Untersuchung des TCR-Repertoires bei.

Dazu wurden schon in verschiedenen Bereichen Protokolle etabliert, wie für den Menschen (300), die Rötelmaus (301), das Schwein (302), den Zebrafisch (303), den Rhesusaffen (304), oder auch das Huhn (12,13,15) und die weiße Pekingente (108). Sie nutzten vor allem das Prinzip der 5' RACE-PCR und Next Generation Sequencing (NGS). Zum Teil wurden auch Unique Molecular Identifiers (UMIs) eingesetzt, welche durch das Markieren einzelner cDNA-Moleküle ermöglichen, PCR-Duplikate vor der bioinformatischen Analyse herauszufiltern und somit eine bessere Quantifizierung der Daten vorzunehmen. Diese Technik wurde schon häufig erfolgreich für NGS angewandt (305-307).

#### 2.6.1 γδ TCR-Repertoire des Säugers

Der TCRγ-Locus des Menschen beinhaltet 6 funktionale Vγ-, 5 Jγ-, und 2 Cγ-Gensegmente, der TCRδ-Locus 8 funktionale Vδ-, 3 Dδ-, 4 Jδ-Gensegmente und 1 Cδ-Gensegment (308). Bei der Maus besteht der TCRγ-Locus aus 4 Clustern bzw. Genkassetten. Der γ1-Cluster setzt sich aus 4 Vγ-Segmenten, 1 Jγ- und 1 Cγ-Segment zusammen, der γ2-Cluster aus jeweils einem Vγ-, Jγ- und Cγ-Segment, so auch der γ3- und der γ4-Cluster (309). Der TCRδ-Locus besteht aus 6 Vδ-, 2 Dδ-, 2 Jδ-Segmenten und 1 Cδ-Segment (94), später wurden 16 Vδ-Segmente entdeckt, eingeteilt in 12 Untergruppen, die aber 10 Vα/δ-Segmente enthalten (310,311). Beim Schwein fand man für den TCRγ-Locus 8 Vγ-, 6 Jγ- und 4 Cγ-Gensegmente (312), für den TCRδ-Locus 28 Vδ-, 6 Dδ-, 4 Jδ-Gensegmente und 1 Cδ-Gensegment (313,314).

 $\gamma\delta$  TCR-Repertoireanalysen bei Mensch und Maus haben gezeigt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen meist eine Gewebespezifität aufweisen, sie exprimieren in diesen Organen einen invarianten TCR und zeigen zum Teil nur eine eingeschränkte Diversität (140).

Die Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Mäusen wird von der Vy-Kette geprägt, z.B. findet man in der Epidermis Vy5V $\delta$ 1+ T-Zellen (151,152,315), diese V $\delta$ 1-Ketten findet man auch in Epithelien der Vagina, des Uterus und der Zunge (154). Im Darm sitzen Vy7+, in der Peripherie Vy1+, und in Dermis, Gehirn, Gelenken und Reproduktionstrakt Vy4+ und Vy6+ T-Zellen (154,156,316). Die  $\gamma\delta$  TCRs in Haut und Uterus der Maus weisen dabei eine nur sehr geringe Diversität auf (123).

Beim Menschen wird die Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen auch durch V-Gensegmente bestimmt, aber mehr von V $\delta$ -Segmenten (316). Im Blut findet man die Hauptpopulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen, nämlich die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen, die dort bis zu 80% der  $\gamma\delta$  T-Zellen ausmachen (316-318), in Geweben dominieren allerdings die nicht-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen.

Die CDR3 $\gamma$ -Sequenzen der fetalen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 $^+$  T-Zellen sind vor allem öffentlich, werden also von verschiedenen Individuen geteilt, die CDR3 $\delta$ -Sequenzen sind eher privat und kommen somit nur individuell vor (166). Die CDR3 $\delta$ -Sequenzen der adulten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 $^+$  T-Zellen sind auch hauptsächlich privat, CDR3 $\gamma$ -Sequenzen der V $\gamma$ 9-Ketten sind normalerweise um die 14 AS lang

(319). Sowohl die fetalen als auch die adulten  $V\gamma 9V\delta 2^+$  Zellen sind häufig mit TRGJP rekombiniert, die Nutzung der J $\delta$ -Segmente wandelt sich allerdings von J $\delta 3$  zu J $\delta 1$  (166). Im intestinalen Epithel des Menschen befinden sich  $V\gamma 4V\delta 1^+$  T-Zellen, die aus öffentlichen  $V\gamma 4^-$ , aber privaten  $V\delta 1^-$ Ketten bestehen (320). Im postnatalen Thymus findet man vor allem  $V\delta 1^+$  T-Zellen (321), so auch in der Leber, in der Lunge hingegen vermehrt  $V\delta 2^+$  T-Zellen (123).

 $V\gamma9V\delta2^+$  T-Zellen kommen auch beim Alpaka häufig im Blut vor,  $V\gamma9$  rearrangiert dabei vor allem mit TRGJP-Varianten,  $V\delta2$  vor allem mit TRDJ4 (322).

Beim Menschen konnte festgestellt werden, dass das  $\gamma\delta$  TCR-Repertoire für mindestens 90 Tage stabil bleibt, eine Änderung könnte daher eher mit z.B. Infektionen zusammenhängen (323). So konnte eine Expansion bestimmter V $\delta$ 2+ Zellen bei Infektion mit Tuberkulose (324,325) und auch Lepra (216) beobachtet werden, bei Tuberkulose wurde in späteren Studien eine vermehrte Repräsentation V $\delta$ 1+ T-Zellen mit verschobenem Repertoire gesehen (326). Eine CMV-Infektion führt zu klonaler Expansion von nicht-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+ Zellen, vor allem V $\delta$ 1+ T-Zellen (323,327). Betroffene zeigen ein verschobenes V $\delta$ 1-Repertoire (328). Auch bei HIV-Infektion kommt es zur V $\delta$ 1-Expansion (329,330).

Zusätzlich scheint es altersabhängige Änderungen des Repertoires zu geben, wie eine klonale Expansion bestimmter nicht-Vy9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen (331,332).

Schweine zeigen im Blut CD2<sup>+</sup> und CD2<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen mit zwei verschiedenen Klonotypen, V $\gamma$ 11J $\gamma$ P1 und V $\gamma$ 10J $\gamma$ P1. Je ein Drittel dieser Zellen ist mit V $\delta$ 1 in Kombination mit J $\delta$ 1 oder J $\delta$ 4 rearrangiert, das D $\delta$ -Segment blieb in einigen Fällen jedoch unidentifiziert. Bei den CD2<sup>+</sup> Zellen nehmen 4 V $\delta$ -Segmente ca. 70% des gesamten Repertoires ein, bei den CD2<sup>-</sup> Zellen nehmen 3 V $\delta$ -Segmente 50% ein (302).

#### 2.6.2 γδ TCR-Repertoire des Haushuhns

Es gibt schone einige frühe Studien, die sich mit der Annotation der  $\alpha/\delta$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Loci des Haushuhns beschäftigten (91,104,106,265,266,333,334). Das Genom des Huhns besitzt nach Kubota et al. (91) für den  $\alpha/\delta$ -Locus 1 V $\delta$ -Familie mit 20-30 Elementen, 2 D $\delta$ -, 2 J $\delta$ -Segmente, 1 C $\delta$ -Segment, und nach Six et al. (104) für den  $\gamma$ -Locus 3 V $\gamma$ -Familien mit jeweils über 10 Elementen, 3 J $\gamma$ -Elemente und 1 C $\gamma$ -Element. Liu et al. (82) zeigten später für den  $\alpha/\delta$ -Locus 31 V $\delta$ -Segmente unterteilt in 4 Subgruppen, 2 D $\delta$ -, 2 J $\delta$ -Segmente und 1 C $\delta$ -Segment. Für den  $\gamma$ -Locus fanden sie 37 V-Segmente unterteilt in 11 Subgruppen, 3 J $\gamma$ -Segmente und 1 C $\gamma$ -Segment. Andere Annotationen, wie die des TCR $\gamma$ -Locus von Zhang et al. (13), zeigten davon leichte Abweichungen bezüglich der V $\gamma$ -Gensegmente, sie fanden 44 Gensegmente eingeteilt in 6 Untergruppen à 6, 19, 9, 4, 3 und 3 Mitgliedern, Dixon et al. (12) fanden 40 V $\gamma$ -Gensegmente eingeteilt in 4 Familien à 6, 22, 7 und 5 Mitgliedern.

Kürzlich wurde dann das Genom des Huxu-Huhns von Früh et al. (15) annotiert, für den TCRγ-Locus fanden sie 4 V-Familien mit insgesamt 53 V-Genen à 8, 27, 10 und 8 Mitgliedern, 3 Jγ-Gene und 1 Cγ-Gen, für den TCR $\delta$ -Locus 5 V-Familien mit 41, 3, 1, 9, und 3 Mitgliedern, 2 D $\delta$ -, 2 J $\delta$ -Gene und 1 C $\delta$ -Gen.

Es wird vermutet, dass die beobachtete hohe Zahl an V $\delta$ -Gensegmenten typisch für Spezies mit hohem  $\gamma\delta$  T-Zell-Anteil ist, Tiere mit geringem Anteil weisen weniger V $\delta$ -Segmente auf (108).

Beim Huhn gibt es noch nicht viele Daten bezüglich ihres  $\gamma\delta$  TCR-Repertoires. Zwei Studien beschreiben das  $\gamma$ -Repertoire (12,13), zu  $\delta$  gibt es jedoch kaum vorherige Daten.

Dixon et al. (12) beobachteten in verschiedenen Organen, dass die meisten y-Segmente zwar exprimiert werden, aber ihr Beitrag zum Repertoire in Thymus und peripheren Geweben variiert, obwohl es sich, verglichen mit Menschen und Mäusen, in den verschiedenen Geweben durchaus ähnelt. Das TCRy-Repertoire besteht aus einigen öffentlichen, zwischen verschiedenen Tieren geteilten, CDR3 Sequenzen. Diese werden aus einer großen Spanne an V-Segmenten gebildet. Aber der Großteil des Repertoires wird nur privat genutzt, genauer 80-100% aller CDR3-Sequenzen. Die größte Diversität sahen sie im Thymus. Eine Familie, TRGV3, wird besonders häufig genutzt, und aus dieser nimmt das TRGV3.3-Gen 30-40% des gesamten Repertoires ein, trägt aber aufgrund hoch diverser CDR3-Sequenzen vor allem zum privaten Repertoire bei. Gene aus anderen Familien werden weniger genutzt, nur jeweils ein Gen kommt deutlich häufiger vor.

Zhang et al. (13) untersuchten das γ-Repertoire im Thymus, wobei sie einige Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Tieren feststellten. 4 der V-Gene nehmen zusammen über 60% des gesamten Repertoires ein, das am häufigsten genutzte Vγ3.7 beansprucht z.B. 20,58%, 6 der VγJγ-Paare nehmen 44% des gesamten Repertoires ein. Sie bestimmten auch die durchschnittliche CDR3-Länge, diese beträgt 12,9 AS.

Für den TCR $\beta$  z.B. wurde der Einfluss der Darm-Mikroflora auf sein Repertoire erforscht (62), was auch noch eine interessante Studie für den  $\gamma\delta$  TCR wäre, da dieser T-Zelltyp im Darm durchaus vertreten ist.

Zum TCR $\delta$ -Repertoire weiß man, dass alle J $\delta$ -Gene in den embryonalen  $\gamma\delta$  T-Zellen zu gleichen Teilen genutzt zu werden scheinen, in adulten  $\gamma\delta$  T-Zellen gibt es eine Tendenz Richtung J $\delta$ 1 (91).

ZIELSETZUNG 25

#### 3 ZIELSETZUNG

Über Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen und ihre Funktion ist bisher nicht viel bekannt, obwohl diese Tiere eine hohe Zahl dieser Zellen besitzen. Auch über ihr Verhalten in Zellkultur über einen längeren Zeitraum und somit den Einfluss bestimmter Stimulationsfaktoren weiß man nicht viel. Eine umfassende Charakterisierung des TCR-Repertoires konnte bisher auch nur zum Teil für  $\gamma$ -Ketten durchgeführt werden, aber nicht für  $\delta$ -Ketten, da keine vollständige Annotation des  $\delta$ -Locus im Hühnergenom existierte. Somit wurde auch der Einfluss eines Langzeitkultursystems auf das TCR-Repertoire nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Langzeitkultursystem für  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Hühnermilz zu etablieren, und zwar mithilfe der Stimulation durch die beiden Zytokine IL-2 und IL-12. Die Ermittlung der bestmöglichen Verdünnung sollte durch BrdU-Proliferationsassays erfolgen. Damit sollte eine Basis geschaffen werden, mit deren Hilfe das Verhalten dieser Zellen besser verstanden werden kann und vielleicht auch Liganden ermittelt und Infektionsversuche über längere Zeit durchgeführt werden können.

Eine genauere Charakterisierung der  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen sollte durch Sort-Versuche dreier Subpopulationen (TCR1+CD8+, TCR1highCD8- und TCR1lowCD8-) aus der Hühnermilz erfolgen, mit anschließendem Kultivieren, Durchführen von BrdU-Proliferationsassays und durchflusszytometrischen Messungen. Die TCR-Repertoireanalysen der  $\gamma$ - und der  $\delta$ -Ketten in Kultur sollten zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen, um etwaige Veränderungen des Repertoires zwischen diesen Zeitpunkten durch das Kultivieren mit IL-2 und IL-12 zu ermitteln, und um zu prüfen, ob nur ein bestimmter  $\gamma\delta$  T-Zellklon auf diese Art der Stimulation reagiert, oder ob die Entwicklungen in der Zellkultur individuell unterschiedlich sind. Sowohl die Charakterisierung als auch die TCR-Repertoireanalysen sollten ebenso dazu dienen,  $\gamma\delta$  T-Zellen und ihr Verhalten in Kultur besser zu verstehen.

PUBLIKATION 27

#### 4 PUBLIKATION

Die Publikation "Chicken  $\gamma\delta$  T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture", erschienen in Frontiers in Immunology, Volume 15, ISSN 1664-3224, doi:10.3389/fimmu.2024.1325024, beschreibt die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit.

Sie ist hier abgedruckt mit Erlaubnis von Frontiers in Immunology durch die Creative Commons Attribution License (CC BY).

TYPE Original Research
PUBLISHED 13 February 2024
DOI 10.3389/fimmu.2024.1325024



#### **OPEN ACCESS**

EDITED BY

Wilhelm Gerner, The Pirbright Institute, United Kingdom

REVIEWED BY

Volker Gerdts, University of Saskatchewan, Canada Nuriban Valero-Pacheco, University of Pennsylvania, United States

\*CORRESPONDENCE Thomas W. Göbel goebel@lmu.de

RECEIVED 20 October 2023 ACCEPTED 15 January 2024 PUBLISHED 13 February 2024

#### CITATION

Linti AE, Göbel TW and Früh SP (2024) Chicken γδ T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture. Front. Immunol. 15:1325024. doi: 10.3389/fimmu.2024.1325024

#### COPYRIGHT

© 2024 Linti, Göbel and Früh. This is an openaccess article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Chicken $\gamma\delta$ T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture

Antonia E. Linti<sup>1</sup>, Thomas W. Göbel<sup>1\*</sup> and Simon P. Früh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Immunology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, <sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Institute of Virology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

In chickens,  $\gamma\delta$  T cells represent a large fraction of peripheral T cells; however, their function remains largely unknown. Here, we describe the selective in vitro expansion of  $\gamma\delta$  T cells from total splenocytes by stimulation with the cytokines IL-2 and IL-12. Under these conditions,  $\gamma\delta$  T cells proliferated preferentially and reached frequencies of >95% within three weeks. Although IL-2 alone also triggered proliferation, an increased proliferation rate was observed in combination with IL-12. Most of the expanded cells were  $\gamma\delta$  TCR and CD8 double-positive. Splenocytes sorted into TCR1+CD8+, TCR1highCD8-, and TCR1<sup>low</sup>CD8<sup>-</sup> subsets proliferated well upon dual stimulation with IL-2/IL-12, indicating that none of the three  $\gamma\delta$  T cell subsets require bystander activation for proliferation. TCR1+CD8+ cells maintained CD8 surface expression during stimulation, whereas CD8<sup>-</sup> subpopulations showed varied levels of CD8 upregulation, with the highest upregulation observed in the TCR1<sup>high</sup> subset. Changes in the  $\gamma\delta$  T-cell receptor repertoire during cell culture from day 0 to day 21 were analyzed by next-generation sequencing of the  $\gamma\delta$  variable regions. Overall, long-term culture led to a restricted  $\gamma$  and  $\delta$  chain repertoire, characterized by a reduced number of unique variable region clonotypes, and specific V genes were enriched at day 21. On day 0, the  $\delta$  chain repertoire was highly diverse, and the predominant clonotypes differed between animals, while the most frequent  $\gamma$ -chain clonotypes were shared between animals. However, on day 21, the most frequent clonotypes in both the  $\gamma$  and  $\delta$  chain repertoires were different between animals, indicating that selective expansion of dominant clonotypes during stimulation seems to be an individual outcome. In conclusion, IL-2 and IL-12 were sufficient to stimulate the *in vitro* outgrowth of  $\gamma\delta$  T cells. Analyses of the TCR repertoire indicate that the culture leads to an expansion of individual T cell clones, which may reflect previous in vivo activation. This system will be instrumental in studying  $\gamma\delta$  T cell function.

KEYWORDS

chicken γδ TCR, IL-2, IL-12, in vitro culture, γδ T cell subsets, TCR repertoire analysis

PUBLIKATION 29

Linti et al. 10.3389/fimmu.2024.1325024

#### 1 Introduction

In birds and mammals, T lymphocytes play a pivotal role in the adaptive immune system. The two distinct groups,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells, express different T cell receptors (TCRs) on their surfaces, which are heterodimers composed of either an alpha and a beta chain, or a gamma and a delta chain, respectively (1–3). Each chain consists of a constant region and a variable region, which are uniquely created during thymic maturation of T cells by somatic DNA recombination of germline V(D)J genes.

In chickens, the genes for TCR $\gamma$  can be found on chromosome 2, for TCR $\beta$  on chromosome 1, and for TCR $\alpha$  and TCR $\delta$  on chromosome 27 (4–9), where the  $\delta$  genes are nested between the TCR $\alpha$  genes (10). In chickens and mammals, some variable (V)  $\alpha$  gene segments can be joined with diversity (D) and joining (J) genes of the  $\delta$  locus, which further increases the combinatorial diversity (4, 10–12). Additionally, a second TCR $\delta$  locus on chromosome 10 with a single set of V, D, J, and constant (C) genes has been described in chickens (13).

Chicken T cells can be identified at the protein level by monoclonal antibody clones TCR1, TCR2, and TCR3, which bind  $\gamma\delta$ , V $\beta$ 1  $\alpha\beta$ , and V $\beta$ 2  $\alpha\beta$  T cells, respectively (14–16).

The functions and effector mechanisms of  $\alpha\beta$  T cells have been well-characterized in many species. Most  $\alpha\beta$  T cells recognize peptides presented by MHCI or MHCII molecules on the surface of antigen-presenting cells. There are two main subsets: CD4<sup>+</sup> T helper  $\alpha\beta$  T cells that recognize peptides presented by MHCII and CD8<sup>+</sup> cytotoxic  $\alpha\beta$  T cells that recognize peptides presented by MHCI (17, 18). On the other hand,  $\gamma\delta$  T cells are not restricted to peptides presented by MHCI or MHCII molecules; instead, they can also directly recognize soluble or unprocessed antigens and nonpeptide antigens, such as glycoproteins. Human  $V\gamma 9V\delta 2^+$  T cells are activated by phosphoantigens (19–21). In addition,  $\gamma\delta$  T cells recognize stress-induced ligands that are upregulated in cells in response to infection and stress, leading to different effector functions such as the orchestration of pathogen clearance (17, 22). In vitro studies have further shown that some  $\gamma\delta$  T cells have cytotoxic effector functions (23) and that they can also present antigens to B cells (24).

 $\gamma\delta$  T cells with innate cell-like features frequently participate in innate immune responses (25–28) and play an important role in tumor surveillance, tissue healing, and protection against intra- and extracellular pathogens (17). Human, mouse, and rat are the so-called  $\gamma\delta$  low species that are characterized by a  $\gamma\delta$  T cell frequency of 1%–10% of all T lymphocytes in peripheral blood (29–31). Pigs (32), cattle, sheep (33, 34), goats (35), and chickens, on the other hand, are considered  $\gamma\delta$  high species. Up to 50% of all circulating T lymphocytes in chicken blood are  $\gamma\delta$  T cells (16), and a large  $\gamma\delta$  T cell population is found in different tissues, including the intestine and spleen, particularly in the red pulp (36, 37).  $\gamma\delta$  T cells are the first T cells generated in the chicken thymus during embryonic development (16).

In chickens,  $\gamma\delta$  T cell frequencies are influenced by the sex and age of the animals. Male chickens, for example, show androgen-induced expansion of  $\gamma\delta$  T cells in the peripheral blood and spleen between 4 months and 6 months of age (38). Despite the overall

high frequency of  $\gamma\delta$  T cells in chickens, little is known about their functions. Previous studies have shown that  $\gamma\delta$  T cells can produce a range of cytokines and interferons, such as IL-10 and IFN- $\gamma$  (39), and exert cytotoxic effector functions (40).  $\gamma\delta$  T cells of MDV-vaccinated chickens exhibit high cytotoxic activities *ex vivo* (41), and chicks infected with *Salmonella typhimurium*, for example, show an expansion of CD8 $\alpha\alpha$  positive  $\gamma\delta$  T cell subsets in the blood and different organs (42, 43).

A high percentage of chicken  $\gamma\delta$  T cells express CD8 on their surfaces in the spleen but only a small percentage in the blood (14, 37). In addition to functioning as a coreceptor for TCR antigen recognition (44), CD8 supports T cell activation through interaction with an intracellular tyrosine protein kinase (45, 46). Previous studies have shown that splenic chicken  $\gamma\delta$  T cells can be stimulated by either IL-2 and Concanavalin A (47) or by a combination of receptor ligation and cytokine-containing tissue culture supernatants when cultured together with  $\alpha\beta$  T cells (37). The responding  $\gamma\delta$  T cells express CD8 on their surface. IL-2 mainly promotes the proliferation of CD8<sup>+</sup> cells (48). In mice, CD8 expression in  $\gamma\delta$  T cells seems to occur due to activation with IL-2 and Concanavalin A only in the presence of  $\alpha\beta$  T cells (49).

Investigating the repertoire of gamma and delta TCRs in chickens and their behavior in cell culture will contribute to a better understanding of this important cell type. In-depth characterization of (clonal)  $\gamma\delta$  T cell populations requires TCR repertoire analyses for both  $\gamma$  and  $\delta$  chains, which has previously not been possible due to an incomplete annotation of the  $\delta$  locus in the chicken genome.

Previous repertoire analyses of  $\gamma$  chains in chickens revealed that the TCR $\gamma$  repertoire is largely composed of highly public CDR3 sequences formed by a wide range of V segments, with a higher proportion of private sequences in tissues, such as the spleen and thymus (8, 50). On the other hand,  $\gamma\delta$  T cells often exhibit tissue specificity in their expression of invariant TCRs, for example, V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 TCR in the skin of mice (17).

In this paper, we describe long-term IL-2 and IL-12 driven culture of chicken splenic  $\gamma\delta$  T cells, characterization of cultured cells, and TCR repertoire analyses at different time points during cell culture.

#### 2 Materials and methods

#### 2.1 Ethics statement

All animal research projects were sanctioned by the Government of Upper Bavaria (identification code: 55.2-1-54-2532.0-60-2015; June 2019). All animal procedures were performed in accordance with the regulations and guidelines established by the Committee and the International Standards for Animal Welfare.

#### 2.2 Animals

Fertilized eggs from the chicken line M11 ( $B^2/B^2$ ) were obtained either from S. Weigend (Federal Research Institute for Animal Health, Mariensee, Germany) or from our own breeding. They were

PUBLIKATION 30

Linti et al. 10.3389/fimmu.2024.1325024

hatched and maintained under conventional conditions at the Institute for Animal Physiology, LMU Munich (Germany). Animals received food and water *ad libitum*. Experiments were performed at the age of 6 weeks–41 weeks in both female and male animals.

#### 2.3 Cytokines

Chicken recombinant IL-2 cytokine was produced as previously described (40). Recombinant chicken IL-12 was produced in a stable IL-12 producing HEK293 cell line. Chicken IL-12p35 and IL-12p40 sequences fused by a glycine-serine linker (40, 51), were cloned into a pcDNA3.1 vector together with an HA-signal peptide and an Nterminal FLAG epitope, and the plasmid was used for the stable transfection of HEK 293 cells using Metafectene® (Biontex). Transfected cells were incubated at 37°C and 5% CO2 for 24 h and selected as stable transfectants with G418 at a concentration of 800 µg/ ml. The supernatant of stable transfectants was tested using sandwich ELISA for the presence of FLAG-tagged recombinant chicken IL-12. Finally, IL-12 producing cells were cultured in a bioreactor (Wheaton<sup>®</sup> Celline TM Bioreactors: Celline 1000 Adherent). The biological activity and optimal dilution for both cytokines were evaluated using bromodesoxyuridin (BrdU) proliferation assay (Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence); Roche) with chicken splenocytes (freshly isolated and cryopreserved).

#### 2.4 Cell preparation and cell culture

Splenocytes were obtained by passing the chicken spleen through a stainless-steel mesh, followed by density gradient centrifugation of the single-cell suspension using Ficoll Histopaque  $^{\odot}$ -1077 (Sigma-Aldrich GmbH). Freshly isolated cells were either used directly for RNA isolation and flow cytometry staining or cultivated at a density of  $1\times10^6$  cells per well in flatbottomed 96 well plates with RPMI cell culture medium containing 8% Fetal Bovine Serum (FBS), 2% chicken serum (ChS), and 1% penicillin/streptomycin (P/S), stimulated with recombinant IL-2 and IL-12, at 40°C and 5% CO2. Cells were treated by demidepletion every two to three days with fresh cell culture medium and fresh cytokines.

## 2.5 Antibodies for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting

Chicken splenocytes were stained with the Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience Fixable Viability Dye e Fluor 780; Invitrogen) to distinguish between live and dead cells. For staining of CD8 positive and  $\gamma\delta$  TCR positive cells, anti CD8-PE (clone CT-8, Phycoerythrin conjugate, mouse IgG1k) and anti TCR1-FITC (clone TCR-1, fluorescein isothiocyanate conjugate, mouse IgG1k) (16) antibodies were obtained from Southern Biotechnology Associates (SBA). The cells were analyzed using a FACS Canto II instrument, 10.000 Events (single cells) were collected in every

experiment. The gating strategy is shown in the Supplementary Material (Supplementary Figure 1). Fluorescence-activated cell sorting was performed with a FACSAria III instrument (BD) using an 80  $\mu$ m nozzle. The measurements were analyzed using FlowJo V10.8.1 Software (BD Life Sciences) (52). Sort-purified cells were counted using a hemocytometer and cultured at 6  $\times$  10<sup>5</sup> cells per well with IL-2 and IL-12, and their proliferation was measured using a BrdU proliferation assay.

#### 2.6 BrdU proliferation assay

BrdU proliferation assay is a non-radioactive DNA assay for the quantification of cell proliferation. Splenocytes, either freshly isolated, cryopreserved, or sort-purified γδ T cells, were cultivated in black 96-well plates with a clear bottom (ViewPlate TM—96 F TC, PerkinElmer) for 72 h with or without IL-2 and IL-12. Next, the cells were labeled with BrdU labeling reagent for another 16 h at 40°C and 5% CO2, during which BrdU was incorporated into the cellular DNA during DNA synthesis in replicating cells. The plates were then dried at 60°C, followed by denaturation and fixation, incubation with anti-BrdU-POD working solution for 90 min, and labeling of the cells with a fluorescent dye. The 96-well plates were measured using a luminometer (Glomax, Promega), and raw measurements in rlu/s (relative light units/s) were analyzed using Excel. The proliferation index (PI) was calculated by dividing the measured fluorescence of stimulated cells by the fluorescence of the unstimulated control cells. Standard deviations were calculated using the Excel software.

### 2.7 RNA isolation, cDNA synthesis, and semi-nested PCRs

To investigate the repertoire of  $\gamma\delta$  T cells, a next-generation sequencing method for the whole  $\gamma\delta$  V region was devised (53, 54) (Schematic explanation of the NGS approach is shown in Supplementary Figure 2). RNA was extracted from  $1 \times 10^7$  cells per condition on day 0 and on day 21 (RNeasy® Mini Kit and RNase-Free DNase Set; Qiagen). The quality and quantity of the isolated RNA were measured using a Bioanalyzer 2100 Expert (Agilent) and a NanoDrop ND-1000 (PeqLab). Only RNA samples with RIN values above 9 and 260/280 and 260/230 ratios greater than 1.8 were used for further processing. Reverse transcription and TCR amplicon generation were performed following chicken-specific adaptation of the approach described by Mamedov et al. (53). In brief, between 350 ng and 400 ng of RNA were reverse transcribed to cDNA by 5'RACE with a SMARTScribe Reverse Transcriptase (Takara) using reverse primers specific to the constant C-region of the gamma and the delta chain in one reaction and a Template Switch Oligonucleotide containing a Unique Molecular Identifier (UMI) (Supplementary Table 1). All primers used are listed in the Supplemental Materials (Supplementary Figure 2, Supplementary Table 2). The barcoding of cDNA allowed us to filter out PCR duplicates in silico, leading to more precise quantitative analysis.

PUBLIKATION 31

Linti et al. 10.3389/fimmu.2024.1325024

1 μl of γδ cDNA was amplified in two semi-nested PCRs using an Advantage2 Polymerase (Takara) and gene-specific reverse primers (Primers in Supplementary Table 2, PCR conditions in Supplementary Table 3). Amplification of gamma and delta chains was conducted in one PCR reaction and the PCR products were purified with magnetic beads (Beckman Coulter TM Agencourt AMPure XP Beads) using a ratio of 1:0.65 (DNA: beads) and eluted in 25 µl nuclease-free water. The second PCR was performed in separate reactions for  $\gamma$  and  $\delta$ . 1µl of purified product from the first PCR was used as a template for the second PCR and the amplicons were separated by electrophoresis on an agarose gel (1% agarose low EEO (Agarose Standard) [Applichem Pancreac] in 1 × TBE buffer) and gel-purified using the Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). The purified samples with attached Universal Adapters were sent to Eurofins for pairedend Illumina sequencing with a read length of  $2 \times 300$  bp and a guaranteed output of 60,000 paired-end reads per sample. Data were delivered as fastq-files.

#### 2.8 Bioinformatic analysis

The fastq-files were further analyzed with a bioinformatic pipeline using FastQC 0.12.0 (55) for quality control, MiXCR v4.3.2 (56, 57), for the alignment and Immunarch 1.0.0 (58) in R v4.2.2 (59) for the graphical representation. The bioinformatic pipeline and annotation of the Huxu chicken genome (60) for the alpha, beta, gamma, and delta V gene segments were established by S. Früh (manuscript in preparation). The raw data (fastq-files) were uploaded to the SRA database and are accessible via the following accession number: PRJNA1054968.

#### 2.9 Statistics

Statistical analyses were performed using R v4.2.2. To compare the differences between the two dependent conditions, paired Student's t-test was performed (used in Supplementary Figure 9). Unpaired Student's t-test was performed to compare the differences between two independent conditions (used in Supplementary Figure 10). To compare differences between more than two dependent conditions, one-way repeated measures ANOVA with Tukey's HSD test as a *post-hoc* test was performed (used in Supplementary Figures 3, 4). Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

#### 3 Results

## 3.1 $\gamma\delta$ T cells proliferate *in vitro* after IL-2/IL-12 stimulation of splenocytes

Initially, we tested the cytokines IL-2 and IL-12 for their potential to induce the proliferation of freshly isolated splenocytes. Different seeding densities in a flat-bottomed 96-well plate, cell culture media, and concentrations of IL-2 and IL-12 were

tested. IL-2 alone induced strong splenocyte proliferation, as measured in a BrdU assay, with the highest proliferation (PI: 2) observed at a dilution of 1:800 (Supplementary Figure 3A). In contrast, the proliferation of splenocytes induced by IL-12 alone was lower (PI between 1 and 0.9 at dilutions of 1:10 to 1:160), with the highest proliferation observed at a 1:80 dilution (Supplementary Figure 3B). Next, we tested whether a combination of these cytokines could further increase proliferation. IL-2 was used at an optimal dilution of 1:800, and IL-12 was added at various dilutions to determine whether proliferation could be further enhanced (Supplementary Figure 3C). In this assay, the proliferation of splenocytes was more than twice as high as that of IL-2 or IL-12 alone, reaching PI values of almost 5, when IL-2 at 1:800 was combined with IL-12 at 1:80 (Figure 1). These cytokine concentrations were used throughout the study, employing the same batch of cytokine preparations.

We also compared different cell densities ranging from  $2.5 \times 10^5$  cells per well and  $5 \times 10^5$  cells per well to  $1 \times 10^6$  cells per well, with the best results obtained at  $1 \times 10^6$  cells per well (Supplementary Figure 4A). In addition, three cell culture media (IMDM + 8%FBS + 2%ChS + 1%P/S, RPMI + 8%FBS + 2%ChS + 1%P/S, and RPMI + 10%FBS + 1%P/S) were tested using a BrdU proliferation assay, and the highest proliferation indices were observed in RPMI + 8%FBS + 2%ChS + 1%P/S (Supplementary Figure 4B).

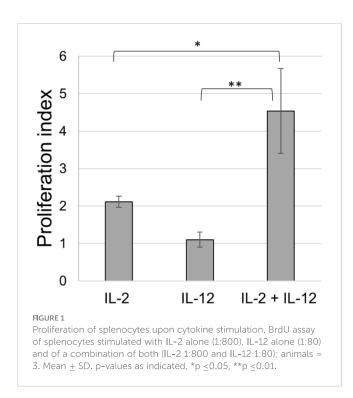
In the next set of experiments, we attempted to extend the culture time of proliferating cells by propagating the cells at an optimal cell density and feeding with fresh medium containing new cytokines every two to three days. These cultures were maintained for up to 3 weeks, with cell viability slightly decreasing towards day 21 (Supplementary Figure 5). Notably, after 21 days of culture, most cells were  $\gamma\delta$  T cells, reaching frequencies up to 90%. Double staining of cells cultured for different time periods using the TCR1 mAb in combination with anti-CD8 demonstrated that the frequency of double-positive cells significantly increased in all tested animals of different sexes and reached values of up to 86% (Figures 2A, B).

These data suggest that the combination of IL-2 and IL-12 in splenocyte cultures favors the selective outgrowth of  $\gamma\delta$  T cells that predominantly express CD8.

## 3.2 Different $\gamma\delta$ T cell populations respond to cytokine stimulation

In previous experiments, splenocytes were used for *in vitro* culture. Thus, it cannot be excluded that the cytokines, rather than directly affecting  $\gamma\delta$  T cells, had an indirect effect on bystander cells. Therefore, the splenocytes of the three male animals were sorted according to their TCR1/CD8 profiles into three distinct subsets. CD8 $^-\gamma\delta$  T cells can be further divided into TCR1 $^{low}$  and TCR1 $^{high}$  subsets. In addition, the TCR1 $^+$ CD8 $^+$  subset was sorted, and these three populations, together with unsorted cells, were subsequently cultivated with IL-2 and IL-12 (Figure 3A). The purity of the sort-purified cells was higher than 95% for all populations (Figure 3A).

A BrdU proliferation assay was performed on different sortpurified populations and unsorted cells as a control (Figure 3B).



Cells from each population were divided into two groups: one group was stimulated with IL-2 and IL-12 and the other was left unstimulated as a negative control. The negative controls proliferated less effectively than the stimulated cells and exhibited low rlu/s. For the three sort-purified populations and unsorted control cells, the assay showed equally high proliferation indices in the animals tested (Figure 3B). Stimulated cells proliferated better than unstimulated controls, while the proliferation capacities of sorted and unsorted stimulated cells were not significantly different.

The cells were reanalyzed by staining and flow cytometry using TCR1 and CT8 mAbs after one week of stimulation with IL-2 and IL-12. Unsorted cells were predominantly TCR1/CD8 double-positive and sorted TCR1+CD8+ cells retained their double-positive phenotype (Figure 3C). Interestingly, on average, about one-third of the TCR1highCD8- cells started to express the CD8 antigen, whereas only a small fraction of the TCR1lowCD8- cells expressed CD8 after stimulation (Figures 3C, D).

In conclusion, IL-2 and IL-12 appear to have a direct effect on  $\gamma\delta$  T cell proliferation. Different  $\gamma\delta$  T cell subsets based on TCR  $\gamma\delta$  and CD8 expression equally react to stimulation with cell proliferation without bystander activation. CD8 subsets start to express CD8 upon cytokine stimulation to varying degrees in the three animals.

## 3.3 Cytokine stimulation of $\gamma\delta$ T cells leads to a restricted TCR repertoire

As a next step, we wanted to characterize the  $\gamma\delta$  TCR repertoire of IL-2/IL-12 stimulated total splenocytes to determine whether specific subsets were preferentially responding. Thus, we analyzed the TCR repertoire before stimulation and after three weeks of cell culture. We used 5'RACE and PCRs to selectively amplify the

expressed TCR $\gamma\delta$  repertoire of three animals of different sexes at days 0 and 21 of cell culture. Amplicons were sequenced on the Illumina platform and the sequences obtained were annotated by alignment to the chicken germline V(D)J genes using MiXCR v4.3.2. Using this approach, more than 90% of the gamma chain sequences and 80% of the delta chain sequences aligned successfully to the reference (Supplementary Figure 6).

Gamma and delta chain repertoires changed drastically during stimulation over the course of 21 days. Overall, long-term culture led to fewer expressed V-regions (Figure 4). Approximately 11,000 unique  $\gamma$ -chain clonotypes were expressed on day 0, which reduced to 1,200 on day 21. Of the approximately 10,000 unique  $\delta$  chain clonotypes on day 0, only 1,300 remained on day 21. The numbers of gamma and delta chain clonotypes were correlated, as the animals with a more restricted gamma repertoire also had a more restricted delta repertoire and vice versa (Supplementary Figure 7).

Most of the V regions expressed on day 21 appeared at a higher frequency than those on day 0 (Figure 5A). This was clearly recognizable in animals 1 and 2, where more than 75% of the  $\gamma$  repertoire was occupied by clonotypes with more than 100 counts (Figure 5A). The same trend, albeit less pronounced, was also observed in the third animal and delta-chain clonotypes (Figure 5A).

The CDR3 clonotype distribution plotted by CDR3 length (spectratype) was approximately normally distributed at day 0 but strongly skewed on day 21 for both  $\gamma$  and  $\delta$  chains (Figure 5B). The most prevalent CDR3 length on day 0 was 15 amino acids (aa) for  $\gamma$  chains and 16 aa for  $\delta$  chains in all animals. After stimulation, the most common  $\gamma$  chain CDR3 length was 17 aa in two animals and 11 aa in the third, whereas for delta, the CDR3 length either did not change (two animals) or shifted to 15 aa in the third animal (Figure 5B). Importantly, the highly skewed spectratype towards a particular CDR3 amino acid length was caused by a single V $\gamma$  gene in all animals and, to a lesser degree, in  $\delta$  chains. The dominant V $\gamma$  clonotypes were found in all three animals on day 0, but this overlap diminished by day 21 (Supplementary Figure 8).

Next, we analyzed the gene usage of the V $\gamma$  and V $\delta$  segments (Figure 6). On day 0, the dominant V $\gamma$  sequences were TRGV2-26, TRGV3-5, and TRGV3-6. However, by day 21, TRGV3-5 usage was predominant (Figure 6A). The gene usage pattern in the  $\delta$  chains was different. TRDV1-2 was the predominant V gene by day 0, but not on day 21, where a different V $\delta$  was overrepresented in every animal (TRDV1-17, TRDV1-9, and TRDV1-37) (Figure 6B).

On days 0 and 21, the most prevalent J $\gamma$  gene was TRGJ3, followed by TRGJ2 and TRGJ1. TRDJ1 was preferentially used in  $\delta$  chains at both time points (Supplementary Figure 9).

Collectively, these data indicate that the  $\gamma\delta$  T cell repertoire is narrowed during culture with IL-2 and IL-12 because of the preferential expansion of T cells originating from the specific V $\gamma$  and V $\delta$  genes. Notably, the predominant V genes and clonotypes on day 21 varied among the different animals.

#### 4 Discussion

Chickens belong to  $\gamma\delta$  high T cell species; hence, a decent fraction of peripheral T cells in various organs bear the  $\gamma\delta$  TCR;

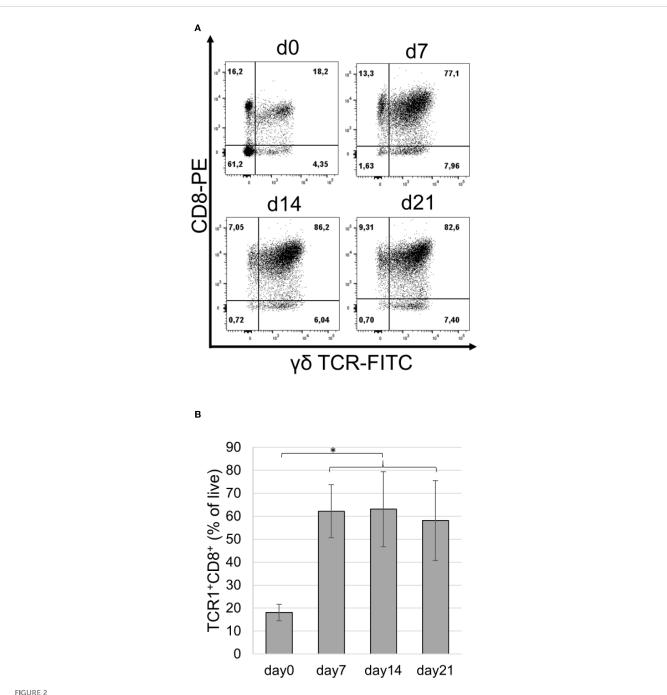


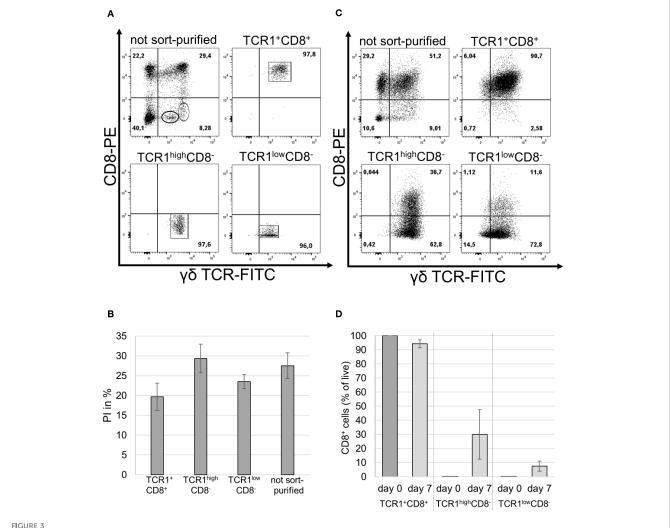
FIGURE 2
Phenotype of IL-2/IL-12 stimulated splenocytes. Splenocytes were stained with TCR1 and CT8 mAbs before culture and on days 7, 14, and 21 (d0, d7, d14, and d21) following repetitive cytokine stimulation. (A) Frequency of cell populations as a percentage of live single cells is indicated. Data from one female chicken representative of three experiments are shown. (B) Frequency of TCR1+CD8+ cells over time in cultured splenocytes from three different animals. Mean  $\pm$  SD; p-values as indicated, \*p  $\leq$ 0.05.

however, the function of these cells is largely unknown. One reason for this lack of knowledge is the inability to culture these cells *ex vivo* under defined conditions. In this paper, we describe a system that can overcome this problem.

To establish selective outgrowth of chicken  $\gamma\delta$  T cells derived from total splenocyte preparations in cell culture, we used the cytokines IL-2 and IL-12. Our decision for the indicated dilutions was made following the titration of IL-2 and IL-12 alone or in combination. The highest proliferation indices were observed with a

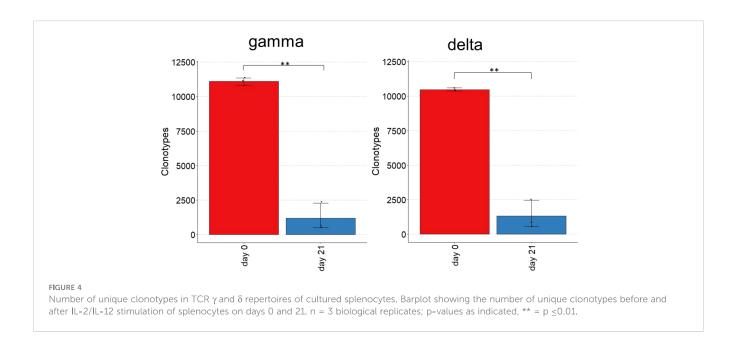
1:800 dilution of IL-2 combined with a 1:80 dilution of IL-12. Consequently, this combination was used for cytokine stimulation of cells in all experiments. Freshly isolated and cryopreserved cells were used to determine the optimal culture conditions. The fact that both cell conditions yielded the same results confirmed the robustness of the system.

We have indicated cytokine dilutions in this manuscript because there are no adequate systems for quantifying chicken IL-2 and IL-12.



Phenotype of IL-2/IL-12 stimulated sort-purified  $\gamma\delta$  T cell populations. (A) Purified splenocytes were stained prior to sorting using TCR1 and CT8 mAbs (top left panel) and the purity of the three sorted  $\gamma\delta$  T cell populations after sort-purification (other panels). One representative experiment is shown, with the frequencies indicated. n = 3 biological replicates. (B) The BrdU assay of sort-purified and unpurified cells stimulated with IL-2/-12. PI was expressed as the percentage of total proliferation. Mean  $\pm$  SD; n = 3 biological replicates; p-values after statistical analysis of the rlu/s of the stimulated sorted and unsorted populations showed no significant differences in their proliferation capacities (p >0.05 = ns). (C) Frequency of IL-2/IL-12 stimulated sort-purified and unpurified populations stained after 7 days in cell culture using TCR1 and CT8 mAbs. One representative of three experiments is shown. (D) Frequency of TCR1+CD8+ cells in the three sorted subpopulations on day 0 and after 7 days in cell culture with IL-2 and IL-12. n = 3 male animals. Mean + SD.

To repeat the stimulation protocol, other laboratories must establish proliferation systems to identify optimal cytokine concentrations. Commercially available chicken IL-2 and IL-12p40 exist, but we were not convinced of their effects in the different assays tested. The combination of IL-2 and IL-12 has already been successfully used in our laboratory to stimulate chicken  $\gamma\delta$  T cells in different experiments (40, 61, 62). Selective outgrowth of  $\gamma\delta$  T cells has also been demonstrated by different stimulation protocols in humans and chickens (37, 63, 64), and Ueta et al. demonstrated that IL-12 has a stimulating effect on  $\gamma\delta$  T cells but not on  $\alpha\beta$  T cells in humans (65). Moreover, Yang et al. observed that IL-12 leads to the expansion of a specific  $\gamma\delta$  T-cell subset (66). The combination of these two cytokines stimulates NK cells in humans and mice (67-70). IL-2 and IL-12 enhance the cytolytic effects of activated T cells in mammals (71), and it has been shown that a combination of IL-2 and IL-12 has a synergistic effect on chicken γδ T cells compared to IL-2 or IL-12 alone. IL-12 alone was not able to induce the cytolytic ability of  $\gamma\delta$  T cells, but the combination of IL-2 and IL-12 strongly induced cytotoxic effector functions (40). The results of BrdU proliferation assays (Figure 1) demonstrated that IL-12 alone barely promoted proliferation, whereas IL-2 boosted proliferation capacity. In previous experiments, we showed that IL-2 preferentially stimulated CD8+ cells in a 6-day culture system, whereas IL-18 induced outgrowth of CD4+ cells (48). However, the TCR phenotype of the cells was not analyzed further. The first attempts to cultivate  $\gamma\delta$  T cells were performed by Kasahara et al. (37), who demonstrated that proliferation was induced only by receptor ligation and cytokine-containing tissue culture supernatant. Moreover, stimulation was only observed in large CD8<sup>+</sup> γδ T cells, as opposed to smaller CD8 $^-\gamma\delta$  T cells, as measured by forward scatter. Choi et al. (47) described a culture system for  $\gamma\delta$  T cells using IL-2 in combination with Concanavalin A (ConA) stimulation. Together,



these studies argue in favor of a dual stimulation requirement, either by TCR crosslinking in combination with cytokine or dual cytokine stimulation, as demonstrated here. Lectin stimulation in splenocyte cultures most likely induces bystander cells to secrete IL-12. We propose that IL-2 or TCR crosslinking is important for upregulating the IL-12 receptor on γδ T cells; however, owing to the lack of reagents to detect the chicken IL-12 receptor, this could not be tested. Berndt et al. (72) introduced a PBL culture system using IL-2 in combination with PMA, which induced the proliferation of  $\gamma\delta$  T cells. We were not able to induce proliferation of blood  $\gamma\delta$  T cells or IEL by co-stimulation with IL-2 and IL-12. These differences may be explained by either the use of different chicken lines or PMA versus IL-12 stimulation used in these studies. As part of future studies, it would be interesting to investigate whether chicken γδ T cells in IL-2 and IL-12 culture systems produce cytokines, such as IFN-γ. This effector function has been described in other species, including pigs (73) and bovines (74), where  $\gamma\delta$  T cells stimulated with IL-2 and IL-12 (among other factors) produce IFN-γ. Different studies have also shown that chicken γδ T cells produce IFN-γ after infection with MDV (39, 75). It is particularly important to determine whether cytokine production and CD8 expression in chickens are related.

During the establishment of the *in vitro* culture system, we encountered several variables that influenced the outcome of the cultures. Splenocyte preparation on day 0 showed a range of 15%–60%  $TCR1^+$  cells. This is partially consistent with earlier studies, where a range of 20%–30% was observed (16, 37). The percentage of  $TCR1^+$  cells differed between female and male animals with 15% to 25% in females and 30 to 60%  $TCR1^+$  cells in males, respectively (Supplementary Figure 10A). An androgen-induced expansion of  $\gamma\delta$  T cells in the blood and spleen of male chickens of 4 months–6 months has been reported previously (38). The proliferation capacities of the male- and female-derived splenocytes were identical. The age of the donor chickens had an effect on culture outcomes. Splenocytes of animals older than 4 months started to

proliferate 2 days-4 days earlier and more reliably than those of animals younger than 4 months (Supplementary Figure 10B).

In the flow cytometry measurements of splenocytes, we observed a distinct behavior of the different subpopulations over time: the double negative cells (TCR1<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) were diminished, the TCR1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells decreased, and the TCR1<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells remained in the same range, whereas the number of double-positive cells (TCR1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) increased (Figure 2A).

To further characterize the IL-2/IL-12 responsive cells (TCR1+CD8+ and TCR1+CD8-) in the splenocyte preparation, we performed sorting experiments of three populations based on  $\gamma\delta$  TCR and CD8 expression. With these experiments, we intended to address the following questions. First, is the proliferation dependent on bystander cells? Second, does only one of the phenotypes determine proliferation capacity? Third, do the different phenotypes remain stable in cell culture? We hypothesized that only CD8<sup>+</sup> cells would proliferate. However, our experiments revealed that all of these populations showed vigorous proliferation with no difference between CD8<sup>-</sup> and CD8+ cells in all animals tested, indicating that there is no need for other cells in culture that either secrete cytokines or are stimulated by cell-cell contact. In addition, the different TCR subsets proliferated, thus excluding the possibility of a subset that is solely reactive to cytokines. The phenotype, as judged by CD8 expression, was unstable during proliferation. On average, about one-third of TCR1<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> cells upregulated CD8 after 7 days, and a fraction of the TCR1 low CD8 cells expressed CD8 following stimulation, whereas the phenotype of TCR1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells remained stable. Thus, we conclude that stimulation leads to the expression of CD8 and that TCR density may be indicative of a previous activation. Interestingly, in experiments performed by Kasahara et al. (37) using negative-sort purified cells, TCR1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells responded well in the presence of ConA or anti-CD3 in combination with exogenous growth factors, whereas CD8- cells did not. The differences in CD8<sup>-</sup> cell proliferation observed in our study may be the result of different stimulation protocols. Studies on Salmonella typhimurium by Berndt et al. (42, 43), for example, showed an increase

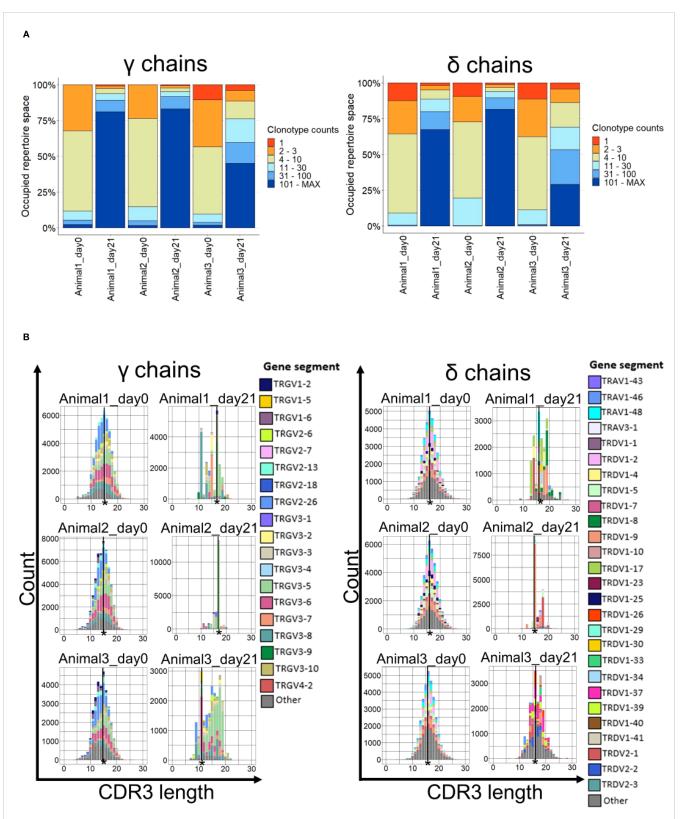
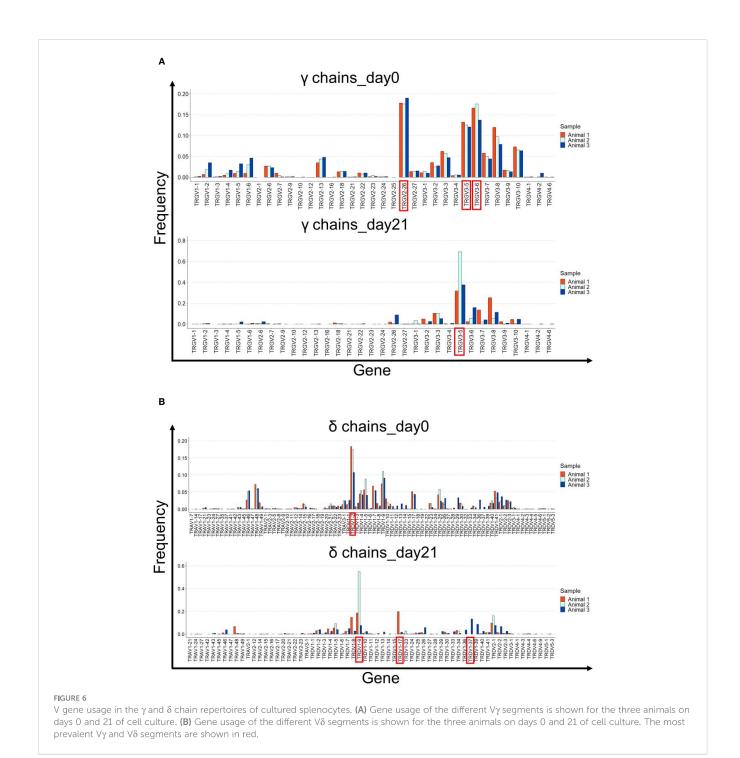


FIGURE 5
Clonality and CDR3 spectratypes of TCR  $\gamma$  and  $\delta$  repertoires. (A) The occupied repertoire space of clonotype groups based on the total count of each unique clonotype in percent. n=3 biological replicates; (B) CDR3 spectratypes (Histograms of the CDR3 lengths in amino acids with the number of occurrences on the y-axis) of the  $\gamma$  and  $\delta$  chains on days 0 and 21. n=3 biological replicates. The most common CDR3 length is indicated (\*).



in CD8<sup>+</sup>TCR1<sup>+</sup> cells after infection. These findings are consistent with our results, but we cannot conclude that there was a change in the CD8 performed to analyze where the contract of t

In the next step of our analyses, we took advantage of a recently developed protocol for TCR profiling in our laboratory (Früh et al. in preparation). This is based on 5' RACE with a primer specific to the constant C region and a template switch oligo, including a unique molecular identifier at the 5' end. TCR variable region amplicons were then generated by two successive rounds of semi-nested PCRs performed on the cDNA, followed by Illumina sequencing. These

phenotype of the expanding cells, as we lacked information regarding

their initial CD8 status.

experiments on mRNA derived from days 0 to 21 of culture were performed to analyze whether only specific clonotypes for gamma and delta were preferentially stimulated by IL-2 and IL-12 among the examined animals and would therefore be responsible for the long-living cells in the culture, or alternatively, whether dominant clonotypes were an individual outcome after stimulation. For example, in humans, IL-12 causes expansion and differentiation of a specific  $\gamma\delta$  T cell subpopulation, namely  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells (66).

Changes in the  $\gamma$  and  $\delta$  repertoires were recognized in different aspects. Long-term culture led to a smaller number of expressed V regions for gamma and delta chains; the expressed V regions

appeared at a higher frequency on day 21, and the dominant clonotypes differed between days 0 and 21. Cell proliferation appears to be independent of the frequency of clonotypes present on day 0, as the most prevalent clonotypes on day 21 do not align with those observed as the most prevalent on day 0 and vary between animals. Thus, the individual outcomes of different cultures may be the result of previous  $in\ vivo$  activation and  $in\ vito$  expansion of cells. This was less pronounced in animal 3, in which the repertoire after stimulation was less restricted. Interestingly, this animal showed the highest proliferation capacity after three weeks of culture. Notably, three weeks after stimulation, the most frequently used V $\gamma$  gene family was identical in all animals.

So far, only a few analyses of the TCR repertoire have been conducted in chickens. In a study by Dixon et al., a single TRGV gene, TRGV3.3, was dominant in all tissues analyzed. This gene comprises 30%–40% of the entire TCR gamma repertoire (8). In contrast, we were unable to identify a single dominant TRGV gene on day 0. This difference may be due to the different chicken genome sequences and lines used for the analyses.

In conclusion, our data demonstrated that chicken  $\gamma\delta$  T cells can be stimulated for extended periods with IL-2 and IL-12 in cell culture. In this culture, there is a shift to a more restricted repertoire. This culture system will be very useful for characterizing  $\gamma\delta$  T cell function in future experiments and for obtaining more information regarding  $\gamma\delta$  TCR ligands.

#### Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the SRA database, accession number PRINA1054968.

#### **Ethics statement**

The animal study was approved by Government of Upper Bavaria, identification code: 55.2-1-54-2532.0-60-2015; June, 2019. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

#### References

- 1. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* (1988) 334(6181):395–402. doi: 10.1038/334395a0
- 2. Cooper MD, Chen CL, Bucy RP, Thompson CB. Avian T cell ontogeny. *Adv Immunol* (1991) 50:87–117. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60823-8
- 3. Chen CH, Six A, Kubota T, Tsuji S, Kong FK, Göbel TW, et al. T cell receptors and T cell development. *Curr Top Microbiol Immunol* (1996) 212:37–53. doi: 10.1007/978-3-642-80057-3
- 4. Liu F, Li J, Lin IYC, Yang X, Ma J, Chen Y, et al. The genome resequencing of TCR loci in gallus gallus revealed their distinct evolutionary features in avians. *Immunohorizons* (2020) 4(1):33–46. doi: 10.4049/immunohorizons.1900095
- 5. Zhang T, Liu G, Wei Z, Wang Y, Kang L, Jiang Y, et al. Genomic organization of the chicken TCR $\beta$  locus originated by duplication of a V $\beta$  segment combined with a trypsinogen gene. *Vet Immunol Immunopathol* (2020) 219:109974. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109974

#### **Author contributions**

AL: Investigation, Writing - original draft, Conceptualization, Formal analysis. SF: Writing - review & editing, Conceptualization, Formal analysis. TG: Writing - review & editing, Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition.

#### **Funding**

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This project was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) in the framework of the Research Unit ImmunoChick (FOR5130) project SCHU 2446/4-1.

#### Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

#### Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2024. 1325024/full#supplementary-material

- 6. Six A, Rast JP, McCormack WT, Dunon D, Courtois D, Li Y, et al. Characterization of avian T-cell receptor gamma genes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93(26):15329–34. doi: 10.1073/pnas.93.26.15329
- 7. Parra ZE, Miller RD. Comparative analysis of the chicken TCRalpha/delta locus. *Immunogenetics* (2012) 64(8):641–5. doi: 10.1007/s00251-012-0621-5
- 8. Dixon R, Preston SG, Dascalu S, Flammer PG, Fiddaman SR, McLoughlin K, et al. Repertoire analysis of gammadelta T cells in the chicken enables functional annotation of the genomic region revealing highly variable pan-tissue TCR gamma V gene usage as well as identifying public and private repertoires. *BMC Genomics* (2021) 22(1):719. doi: 10.1186/s12864-021-08036-9
- 9. International Chicken Genome Sequencing C. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* (2004) 432(7018):695–716. doi: 10.1038/nature03154
- 10. Kubota T. Characterization of an Avian (Gallus gallus domesticus) TCRad Gene Locus. *J Immunol* (1999) 163:3858–66. doi: 10.4049/jimmunol.163.7.3858

- 11. Clark SP, Arden B, Kabelitz D, Mak TW. Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies. *Immunogenetics* (1995) 42(6):531–40. doi: 10.1007/bf00172178
- 12. Genevée C, Chung V, Diu A, Hercend T, Triebel F. TCR gene segments from at least one third of Va subfamilies rearrange at the  $\delta$  locus. *Mol Immunol* (1994) 31 (2):109–15. doi: 10.1016/0161-5890(94)90083-3
- 13. Parra ZE, Mitchell K, Dalloul RA, Miller RD. A second TCRdelta locus in Galliformes uses antibody-like V domains: insight into the evolution of TCRdelta and TCRmu genes in tetrapods. *J Immunol* (2012) 188(8):3912–9. doi: 10.4049/jimmunol.1103521
- 14. Chen CL, Cihak J, Lösch U, Cooper MD. Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. *Eur J Immunol* (1988) 18(4):539–43. doi: 10.1002/eji.1830180408
- 15. Chen CH, Sowder JT, Lahti JM, Cihak J, Losch U, Cooper MD. TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86(7):2351–5. doi: 10.1073/pnas.86.7.2351
- 16. Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* (1988) 167(2):315–22. doi: 10.1084/jem.167.2.315
- 17. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* (2010) 10 (7):467–78. doi: 10.1038/nri2781
- 18. Herrmann T, Karunakaran MM, Fichtner AS. A glance over the fence: Using phylogeny and species comparison for a better understanding of antigen recognition by human gammadelta T-cells. *Immunol Rev* (2020) 298(1):218–36. doi: 10.1111/imr.12919
- 19. Constant P, Davodeau F, Peyrat M-A, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human γδ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* (1994) 264(5156):267–70. doi: 10.1126/science.8146660
- 20. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* (1995) 375 (6527):155–8. doi: 10.1038/375155a0
- 21. Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli. *FEBS Lett* (2001) 509 (2):317–22. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03191-x
- 22. Born WK, Yin Z, Hahn YS, Sun D, O'Brien RL. Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. *J Immunol* (2010) 184(8):4055–61. doi: 10.4049/jimmunol.0903679
- 23. Phillips JH, Weiss A, Gemlo BT, Rayner AA, Lanier LL. Evidence that the T cell antigen receptor may not be involved in cytotoxicity mediated by gamma/delta and alpha/beta thymic cell lines. *J Exp Med* (1987) 166(5):1579–84. doi: 10.1084/jem.166.5.1579
- 24. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* (2005) 309(5732):264–8. doi: 10.1126/science.1110267
- 25. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* (2007) 215:59–76. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x
- 26. Bedoui S, Gebhardt T, Gasteiger G, Kastenmuller W. Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. *Nat Immunol* (2016) 17(5):490–4. doi: 10.1038/ni.3432
- 27. Born WK, Jin N, Aydintug MK, Wands JM, French JD, Roark CL, et al. gammadelta T lymphocytes-selectable cells within the innate system? *J Clin Immunol* (2007) 27(2):133–44. doi: 10.1007/s10875-007-9077-z
- 28. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. Nat Rev Immunol (2013) 13(2):88–100. doi: 10.1038/nri3384
- 29. Hayday AC.  $\gamma\delta$  Cells: A right time and a right place for a conserved third way of protection. Annu Rev Immunol (2000) 18(1):975–1026. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.975
- 30. Shekhar S, Milling S, Yang X. Migration of  $\gamma\delta$  T cells in steady-state conditions. Veterinary Immunol Immunopathology. (2012) 147(1):1–5. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.03.016
- 31. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* (1993) 11:637–85. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003225
- 32. Piriou-Guzylack L, Salmon H. Membrane markers of the immune cells in swine: an update.  $\it Vet Res~(2008)~39(6):54.~doi:~10.1051/vetres:2008030$
- 33. Mackay CR, Hein WR. A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int Immunol* (1989) 1(5):540–5. doi: 10.1093/intimm/1.5.540
- 34. McClure SJ, Hein WR, Yamaguchi K, Dudler L, Beya MF, Miyasaka M. Ontogeny, morphology and tissue distribution of a unique subset of CD4-CD8- sheep T lymphocytes. *Immunol Cell Biol* (1989) 67(Pt4):215–21. doi: 10.1038/icb.1989.33
- 35. Caro MR, Gallego MC, Buendía AJ, Navarro E, Navarro JA. Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. *Res Veterinary Science*. (1998) 65(2):145–8. doi: 10.1016/S0034-5288(98)90166-7
- 36. Bucy RP, Chen CL, Cihak J, Lösch U, Cooper MD. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* (1988) 141(7):2200–5. doi: 10.4049/jimmunol.141.7.2200

- 37. Kasahara Y, Chen CH, Cooper MD. Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in *vivo* priming. *Eur J Immunol* (1993) 23(9):2230–6. doi: 10.1002/eji.1830230927
- 38. Arstila TP, Lassila O. Androgen-induced expression of the peripheral blood gamma delta T cell population in the chicken. *J Immunol* (1993) 151(12):6627–33. doi: 10.4049/jimmunol.151.12.6627
- 39. Laursen AMS, Kulkarni RR, Taha-Abdelaziz K, Plattner BL, Read LR, Sharif S. Characterizaton of gamma delta T cells in Marek's disease virus (Gallid herpesvirus 2) infection of chickens. *Virology* (2018) 522:56–64. doi: 10.1016/j.virol.2018.06.014
- 40. Fenzl L, Göbel TW, Neulen ML. γδ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken. *Dev Comp Immunol* (2017) 73:175–83. doi: 10.1016/j.dci.2017.03.028
- 41. Matsuyama-Kato A, Iseki H, Boodhoo N, Bavananthasivam J, Alqazlan N, Abdul-Careem MF, et al. Phenotypic characterization of gamma delta (gammadelta) T cells in chickens infected with or vaccinated against Marek's disease virus. *Virology* (2022) 568:115–25. doi: 10.1016/j.virol.2022.01.012
- 42. Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Veterinary Immunol Immunopathology* (2001) 78(2):143–61. doi: 10.1016/S0165-2427 (00)00264-6
- 43. Berndt A, Pieper J, Methner U. Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. *Infect Immun* (2006) 74 (7):3967–78. doi: 10.1128/iai.01128-05
- 44. Littman DR. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu Rev Immunol* (1987) 5:561–84. doi: 10.1146/annurev.iy.05.040187.003021
- 45. Veillette A, Ratcliffe MJ. Avian CD4 and CD8 interact with a cellular tyrosine protein kinase homologous to mammalian p56lck. *Eur J Immunol* (1991) 21(2):397–401. doi: 10.1002/eji.1830210222
- 46. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* (1988) 55(2):301–8. doi: 10.1016/0092-8674(88)90053-0
- 47. Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on  $\gamma\delta$  T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and  $\gamma\delta$  T-cells. *Veterinary Immunol Immunopathology* (2000) 73(3):309–21. doi: 10.1016/S0165-2427(00)00148-3
- 48. Goübel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, Weigend S, et al. IL-18 stimulates the proliferation and IFN- $\gamma$  Release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a th1-like system in a nonmammalian species1. *J Immunol* (2003) 171(4):1809–15. doi: 10.4049/jimmunol.171.4.1809
- 49. Spetz AL, Kourilsky P, Larsson-Sciard EL. Induction of CD8 molecules on thymic gamma/delta T cells in *vitro* is dependent upon alpha/beta T cells. *Eur J Immunol* (1991) 21(11):2755–9. doi: 10.1002/eji.1830211116
- 50. Zhang T, Li Q, Li X, Kang L, Jiang Y, Sun Y. Characterization of the chicken T cell receptor gamma repertoire by high-throughput sequencing.  $\it BMC$  Genomics (2021) 22(1):683. doi: 10.1186/s12864-021-07975-7
- 51. Degen WG, van Daal N, van Zuilekom HI, Burnside J, Schijns VE. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *J Immunol* (2004) 172(7):4371–80. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4371
- 52. Becton, Dickinson and Company. FlowJo(TM) Software (for Windows) Version 10.8.1.2023.
- 53. Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV, et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* (2013) 4:456. doi: 10.3389/fimmu.2013.00456
- 54. Migalska M, Sebastian A, Radwan J. Profiling of the TCRbeta repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. *Sci Rep* (2018) 8(1):11613. doi: 10.1038/s41598-018-30037-0
- 55. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. (2010). Available at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc.
- 56. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* (2015) 12(5):380–1. doi: 10.1038/nmeth.3364
- 57. Bolotin DA, Poslavsky S, Davydov AN, Frenkel FE, Fanchi L, Zolotareva OI, et al. Antigen receptor repertoire profiling from RNA-seq data. *Nat Biotechnol* (2017) 35(10):908–11. doi: 10.1038/nbt.3979
- $58.\ Nazarov\ V,\ Tsvetkov\ V,\ Fiadziushchanka\ S,\ Rumynskiy\ E,\ Popov\ A,\ Balashov\ I,$  et al. immunarch: bioinformatics analysis of T-cell and B-cell immune repertoires. (2023). doi: 10.5281/zenodo.3367200
- 59. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing (2022).
- 60. Huang Z, Xu Z, Bai H, Huang Y, Kang N, Ding X, et al. Evolutionary analysis of a complete chicken genome.  $Proc\ Natl\ Acad\ Sci\ U\ S\ A.$  (2023) 120(8):e2216641120. doi: 10.1073/pnas.2216641120
- 61. Huhle D, Hirmer S, Gobel TW. Splenic gammadelta T cell subsets can be separated by a novel mab specific for two CD45 isoforms. *Dev Comp Immunol* (2017) 77:229–40. doi: 10.1016/j.dci.2017.08.013
- 62. Scherer S, Gobel TW. Characterisation of chicken OX40 and OX40L. *Dev Comp Immunol* (2018) 82:128–38. doi: 10.1016/j.dci.2018.01.014

- 63. Rajasekar R, Augustin A. Selective proliferation of gamma delta T lymphocytes exposed to high doses of ionomycin. *J Immunol* (1992) 149(3):818–24. doi: 10.4049/jimmunol.149.3.818
- 64. Behr C, Dubois P. Preferential expansion of V $\gamma$ 9 V $\delta$ 2 T cells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of Plasmodium falciparum. *Int Immunol* (1992) 4(3):361–6. doi: 10.1093/intimm/4.3.361
- 65. Ueta C, Kawasumi H, Fujiwara H, Miyagawa T, Kida H, Ohmoto Y, et al. Interleukin-12 activates human gamma delta T cells: synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* (1996) 26(12):3066–73. doi: 10.1002/eji.1830261237
- 66. Yang R, Yao L, Shen L, Sha W, Modlin RL, Shen H, et al. IL-12 expands and differentiates human vgamma2Vdelta2 T effector cells producing antimicrobial cytokines and inhibiting intracellular mycobacterial growth. *Front Immunol* (2019) 10:913. doi: 10.3389/fimmu.2019.00913
- 67. Hodge DL, Schill WB, Wang JM, Blanca I, Reynolds DA, Ortaldo JR, et al. IL-2 and IL-12 alter NK cell responsiveness to IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 by down-regulating CXCR3 expression1. *J Immunol* (2002) 168(12):6090–8. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6090
- 68. Hou R, Goloubeva O, Neuberg DS, Strominger JL, Wilson SB. Interleukin-12 and interleukin-2-induced invariant natural killer T-cell cytokine secretion and perforin expression independent of T-cell receptor activation. *Immunology* (2003) 110(1):30-7. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01701.x
- 69. Gollob JA, Schnipper CP, Murphy EA, Ritz J, Frank DA. The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated

- with the augmentation of STAT serine phosphorylation. J Immunol (1999) 162 (8):4472–81. doi: 10.4049/jimmunol.162.8.4472
- 70. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J Exp Med (1989) 170(3):827–45. doi:  $10.1084/\mathrm{jem.170.3.827}$
- 71. Mehrotra PT, Wu D, Crim JA, Mostowski HS, Siegel JP. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* (1993) 151 (5):2444–52. doi: 10.4049/jimmunol.151.5.2444
- 72. Polasky C, Weigend S, Schrader L, Berndt A. Non-specific activation of CD8 $\alpha$ -characterised  $\gamma\delta$  T cells in PBL cultures of different chicken lines. *Veterinary Immunol Immunopathology.* (2016) 179:1–7. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.07.008
- 73. Sedlak C, Patzl M, Saalmuller A, Gerner W. IL-12 and IL-18 induce interferongamma production and *de novo* CD2 expression in porcine gammadelta T cells. *Dev Comp Immunol* (2014) 47(1):115–22. doi: 10.1016/j.dci.2014.07.007
- 74. Price SJ, Sopp P, Howard CJ, Hope JC. Workshop cluster 1+ gammadelta T-cell receptor T cells from calves express high levels of interferon-gamma in response to stimulation with interleukin-12 and -18. *Immunology*. (2007) 120(1):57–65. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02477.x
- 75. Matsuyama-Kato A, Shojadoost B, Boodhoo N, Raj S, Alizadeh M, Fazel F, et al. Activated chicken gamma delta T cells are involved in protective immunity against marek's disease. *Viruses* (2023) 15(2):285–308. doi: 10.3390/v15020285

SUPPLEMENTARY MATERIAL 41

#### **5 SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Im Folgenden ist das Supplementary Material zur Publikation "Chicken  $\gamma\delta$  T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture", erschienen in Frontiers in Immunology, Volume 15, ISSN 1664-3224, doi:10.3389/fimmu.2024.132502, wiedergegeben.



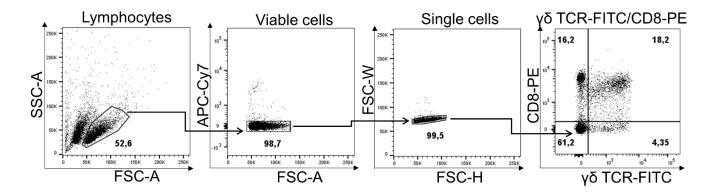
#### Supplementary Material

## Chicken γδ T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture

Antonia E. Linti, Thomas W. Göbel\*, Simon P. Früh

\* Correspondence: Thomas W. Göbel: goebel@lmu.de

#### Suppl. Fig. 1

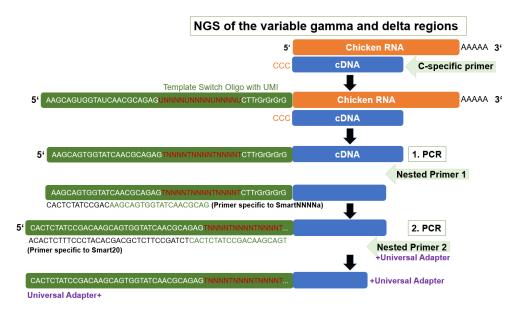


Suppl. Fig. 1: Gating strategy for flow cytometry analysis.

Splenocytes were isolated by density-gradient centrifugation and stained with TCR1 and CT8 mAbs, and a Fixable Viability Dye. Percentages of the different cell populations are indicated.

Supplementary Material

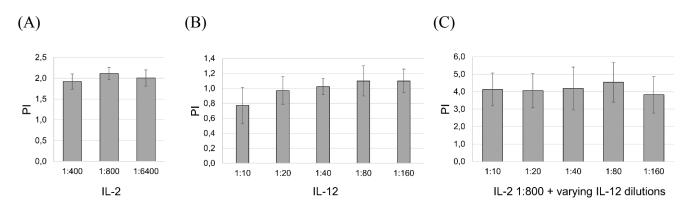
#### Suppl. Fig. 2



**Suppl. Fig. 2:** Amplification of TCR  $\gamma\delta$  variable regions.

Schematic overview of cDNA synthesis and semi-nested PCR amplification of TCR variable regions with Primers used in each step.

#### Suppl. Fig. 3

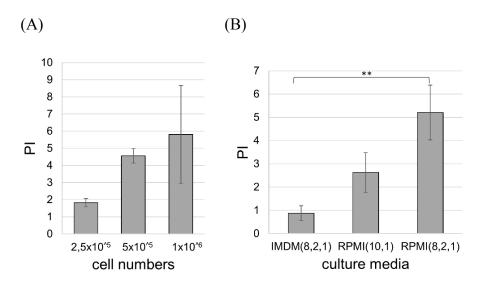


**Suppl. Fig. 3:** Titrations of IL-2 and IL-12.

(A) BrdU assay of splenocytes stimulated with IL-2 at various dilutions (initial dilution 1:400, 2-fold dilutions). (B) BrdU assay of splenocytes stimulated with IL-12 at various dilutions (initial dilution 1:10, 2-fold dilutions). (C) BrdU assay of splenocytes stimulated with a combination of IL-2 (1:800) and IL-12 at various dilutions (initial dilution 1:10, 2-fold dilutions).

For (A), (B) and (C), animals = 3. Mean  $\pm$  SD; p-values in (A), (B) and (C) p > 0.05 = not significant.

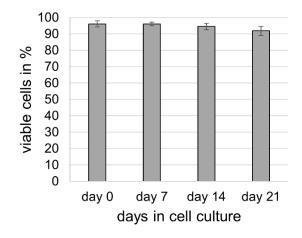
#### Suppl. Fig. 4



**Suppl. Fig. 4:** Comparison of proliferation with varying seeding densities and different cell culture media.

(A) BrdU assay of splenocytes stimulated with IL-2 (1:800) and IL-12 (1:80). Proliferation indices of splenocytes at different seeding densities (2,5x10^5, 5x10^5 and 1x10^6 cells/well). (B) BrdU assay of splenocytes stimulated with IL-2 (1:800) and IL-12 (1:80). Proliferation indices of cells in different culture media (IMDM 8%FBS, 2%ChS and 1%P/S, RPMI 10%FBS and 1%P/S and RPMI 8%FBS, 2%ChS and 1%P/S). For (A) and (B), animals = 3. Mean  $\pm$  SD; p-values in (A) and (B) p > 0.05 = not significant, unless indicated otherwise: \*\* = p  $\leq$  0.01.

#### Suppl. Fig. 5

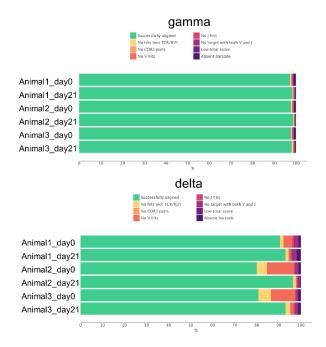


**Suppl. Fig. 5:** Cell viability of splenocytes stimulated with IL-2 and IL-12 over time.

Cell viability (% of lymphocytes) of splenocytes stimulated with IL-2 and IL-12 was determined by staining with a Fixable Viability Dye and flow cytometry analysis on day 0, day 7, day 14 and day 21. Animals = 3; Mean  $\pm$  SD.

Supplementary Material

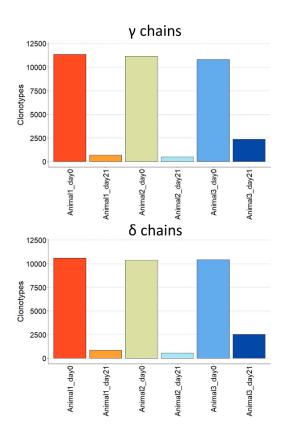
#### Suppl. Fig. 6



**Suppl. Fig. 6**: Alignment rate of raw sequences using MiXCR and a custom V(D)J reference gene library.

Successfully aligned sequences (green) are shown for  $\gamma$  (top) and  $\delta$  (bottom) chain amplicons from three animals at day 0 and day 21.

#### Suppl. Fig. 7

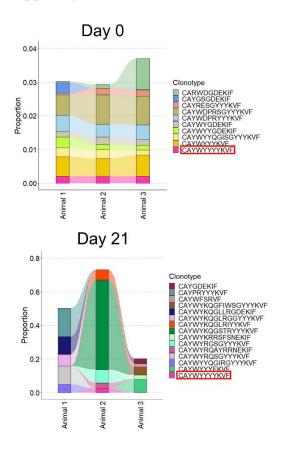


**Suppl. Fig. 7:** Number of unique clonotypes in  $\gamma$  and  $\delta$  chain repertoires on day 0 and day 21 of cell culture.

For each animal the number of unique clonotypes on day 0 and day 21 (Animal1\_day0, Animal1\_day21, Animal2\_day0, Animal2\_day21, Animal3\_day0, Animal3\_day21) is indicated for  $\gamma$  and  $\delta$  chains.

Supplementary Material

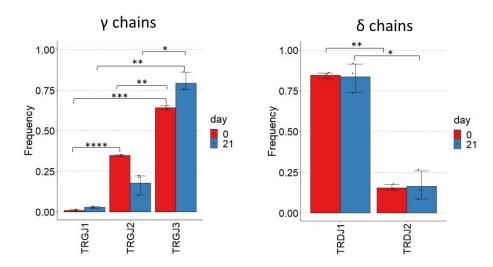
#### Suppl. Fig. 8



**Suppl. Fig. 8:** Clonotype tracking of the most abundant clonotypes on day 0 and day 21 for  $\gamma$  chain TCR sequences.

The most abundant  $\gamma$  chain CDR3 clonotypes (see legend) across animals were compared on day 0 and day 21. Red box indicates a clonotype that was among the most frequent clonotypes on day 0 and day 21 of cell culture. Animals = 3.

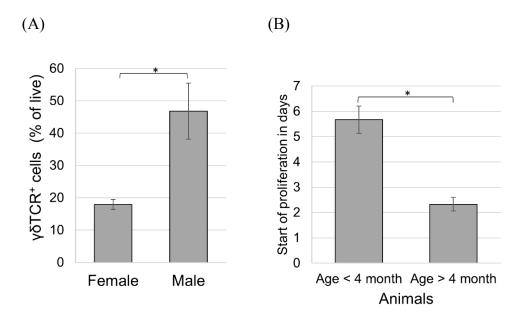
#### Suppl. Fig. 9



**Suppl. Fig. 9:** Jy and J $\delta$  gene usage on day 0 and day 21.

J gene usage of the different J $\gamma$  and J $\delta$  segments is shown for three animals on day 0 and day 21 (see legend). p-values as indicated, \* = p  $\leq$  0.05, \*\* = p  $\leq$  0.01, \*\*\* = p  $\leq$  0.001, \*\*\*\* = p  $\leq$  0.0001. All other comparisons: p > 0.05 = not significant.

#### Suppl. Fig. 10



**Suppl. Fig. 10:** Impact of sex and age on  $\gamma\delta$  T cell frequency and proliferation.

(A)  $\gamma\delta$  TCR frequencies in freshly isolated splenocytes on day 0 depicted separately for female and male animals (each = 3) (% of live lymphocytes). (B) The start of proliferation comparing animals younger than 4 months with animals older than 4 months (each = 3). (A) and (B): Mean  $\pm$  SD; p-values as indicated, \* = p  $\leq$  0.05.

Suppl. Table 1: cDNA-synthesis for gamma and delta.

Primer Annealing	72°C for 3min 42°C for 2min	- Mix1 (4,5μl): specific primers (0,5μM each) and RNA	
Reverse Transcription	42°C for 90min 70°C for 10min	<ul> <li>Mix2 (5,5μl): reverse transcriptase (10U), buffer (1x), dNTPs (1mM each), DTT (2,5mM), oligonucleotide with UMI (1μM), RNase inhibitor (1U)</li> <li>Mix2 to Mix1 (10μl)</li> <li>Ligation of 5' oligonucleotide</li> </ul>	
Digest of unbound UMI	37°C for 60min	- Add 5μl USER® Enzyme per reaction (Uracil DNA glycosylase, NEB)	
Storage	-20°C	- Storage temperature	

Suppl. Table 2: List of used primers for cDNA synthesis, first and second PCR.

	Oligonucleotide with integrated UMI	forward	SmartNNNNa	AAGCAGUGGTAUCAACGCAGAGUNNNNUNNNUNNNNUCTTrGrGrG
cDNA synthesis	Specific primer to C region gamma	reverse	CHTCRg_1	CATCGGTCCATTTCACCCGA
	Specific primer to C region delta	reverse	CHTCRd_1	TCATTAGAGGACATCTCCAAA
	Primer specific to SmartNNNNa	forward	Smart20	CACTCTATCCGACAAGCAGTGGTATCAACGCAG
First PCR	Nested primer C-region gamma	reverse	CHTCRg_2	TCATGTTCCTCCTGCATGATTTC
	Nested primer C-region delta	reverse	CHTCRd_2	TGATTTCATCACAATGACCTCTGG
	Primer specific to Smart20 with Universal Adapter gamma	forward	Step_1_g	(ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT)CACTCTATCCGACAAG CAGT
Second PCR	Primer specific to Smart20 with Universal Adapter delta and a barcode	forward	Step_1_d	(ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT)CGCAACACTCTATCCG ACAAGCAGT
	Nested primer C-region with Universal Adapter gamma	reverse	CHTCRg_3	(GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT)CTGGTGCTGAACTTCCT TTGTC
	Nested primer C-region with Universal Adapter delta and a barcode	reverse	CHTCRd_3	(GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT)GCTGCGAATAGAATCTC TCTGCTCCC

SUPPLEMENTARY MATERIAL 50

**Suppl.** Table 3: PCR cycling conditions for the first and second PCR.

	First PCR	Second PCR
<b>Initial Denaturation</b>	95°C for 1min	95°C for 1min
Denaturation	95°C for 20sec	95°C for 20sec
Annealing	65°C for 20sec	65°C for 20sec
Elongation	72°C for 50sec	72°C for 50sec
Final Elongation	72°C for 2min	72°C for 5min
Number of cycles	For gamma + delta: 18	For gamma 12, for delta 15

#### 6 DISKUSSION

Obwohl Hühner, zusammen mit Schweinen, Rindern, Schafen und Ziegen (8,171,173,174,268), zu den Spezies mit einem hohen  $\gamma\delta$  T-Zell-Anteil gehören, also eine große Zahl der peripheren T-Zellen in verschiedenen Organen den  $\gamma\delta$  TCR auf der Oberfläche trägt, ist nur wenig zu ihrer Funktion bekannt. Ihr hohes Vorkommen impliziert aber durchaus eine gewisse Relevanz dieses Zelltyps für das Immunsystem. Daher ist es wichtig, einen genaueren Blick auf die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Huhns zu werfen.

6.1 γδ T-Zellen proliferieren in vitro nach IL-2- und IL-12-Stimulation von Milzzellen

Einer der Gründe, weshalb man bisher wenig über diese Zellen weiß, ist, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen bislang *ex vivo* nur schwer zu kultivieren waren. Hier beschreiben wir ein Kultursystem, das dieses Problem löst und somit zu weiteren Erkenntnissen beitragen kann.

Um ein selektives Wachstum von Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Gesamtheit aller Milzzellen in Zellkultur zu erreichen, haben wir die beiden Zytokine IL-2 und IL-12 verwendet. Bei Säugern und Huhn wird IL-2 von T-Zellen produziert und dient der Proliferation und Differenzierung derselbigen (247). IL-12 wird hingegen von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert und dient beim Menschen unter anderem der Aktivierung von NK-Zellen (239). Die Abwesenheit von IL-12 führt sowohl beim Menschen als auch beim Huhn zu einer Störung der IFN- $\gamma$ -Produktion (297,335). Beide Zytokine binden an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und lösen dadurch in ihrer Zielzelle die jeweilige Signaltransduktion aus. Beim Huhn findet man den IL-2-Rezeptor (IL-2R) auf Makrophagen, Thrombozyten und T-Zellen, er dient als Marker für die T-Zell-Aktivierung (63,67,336).

Die für unser Kultursystem genutzten Zytokin-Verdünnungen wurden mithilfe von BrdU-Proliferationsassays durch Titrationen des IL-2 und des IL-12 bestimmt, wobei die beiden Zytokine jeweils alleine oder auch in Kombination getestet wurden. Die höchsten Proliferationsindices zeigten sich bei der Kombination der Zytokine, mit einer 1:800-Verdünnung des IL-2 und einer 1:80-Verdünnung des IL-12. Somit wurde diese Kombination in allen weiteren Experimenten für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimulation eingesetzt. Sowohl frisch isolierte als auch aufgetaute kryokonservierte Milzzellen wurden für die Ermittlung der optimalen Verdünnung genutzt und zeigten interessanterweise dieselben Ergebnisse. Wir hatten eher erwartet, dass die aufgetauten Zellen aufgrund der Lagerung weniger gut auf die Stimulation ansprechen würden. Dass dieses Kultursystem bei solch unterschiedlich behandelten Zellen jedoch gleich gut funktioniert, spricht für seine Robustheit.

Hühner-IL-2 und Hühner-IL-12p40 sind zwar kommerziell erhältlich, waren aber in verschiedenen in unserem Labor getesteten Assays nicht überzeugend, daher entschieden wir uns für die Herstellung unseres eigenen IL-2 und IL-12. Der Vergleich der kommerziell erhältlichen Zytokine mit den selbst hergestellten ergab, dass die Kommerziellen zu weniger guten Ergebnissen in BrdU-Proliferationsassays führten, also eine geringere Proliferation der mit ihnen stimulierten Milzzellen erreichten.

Wir haben in dieser Arbeit die von uns eingesetzten Zytokin-Verdünnungen angegeben, da es kein adäquates System gibt, die Konzentration von Hühner-IL-2 und -IL-12 zu bestimmen. Die bei Säugern häufig genutzte Methode eines indirekten Sandwich-ELISAs (337) ist beim Huhn aufgrund des Mangels an notwendigen Reagenzien, wie einem passenden Zytokin-Standard für das jeweilige Zytokin zur Erstellung von Standardkurven, aktuell noch nicht anwendbar. Spezifische Antikörper gegen Hühner-IL-12p40 (338) und gegen Hühner-IL-2 (339,340) wurden zwar generiert, aber nicht für die Quantifizierung des Zytokins etabliert. Somit sollten andere Laboratorien, wenn sie dieses Stimulationsprotokoll reproduzieren wollen, die optimale Verdünnung ihrer Zytokine ebenso mit Proliferationsassays, wie dem BrdU-ELISA, bestimmen. Ein weiterer Punkt, der dafürspricht, ist die Tatsache, dass nicht jedes Labor dieselbe Hühnerlinie für ihre Versuche nutzt und es durchaus möglich ist, dass die Milzzellen dieser anderen Linien sensitiver oder weniger sensitiv auf die Zytokine reagieren. Somit würden die Angaben einer genauen Konzentration nur als Anhaltspunkt dienen, aber die optimale Verdünnung müsste dennoch, bestenfalls durch einen Proliferationsassay, bestimmt werden.

Die Kombination aus IL-2 und IL-12 wurde auch zuvor schon erfolgreich in unserem Labor für verschiedene Experimente eingesetzt, um Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen zu stimulieren. Fenzl et al. (281) führten mithilfe dieses Stimulationsprotokolls Zytotoxizitätsassays mit  $\gamma\delta$  T-Zellen durch, Huhle et al. (293) nutzten es, um die Expression eines neuen CD45-spezifischen mAK auf  $\gamma\delta$  T-Zellen zu testen, und Scherer et al. (294) charakterisierten OX40 und OX40L, ein wichtiges costimulatorisches Molekül der T-Zellen (341), unter anderem auf mit IL-2 und IL-12 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Aufgrund des Nutzens eines solchen Kultursystems entschieden wir uns, es ausführlicher zu testen und zu optimieren, um bestmögliche Proliferationsergebnisse zu erzielen und dadurch zu ermöglichen, Hühner-γδ T-Zellen basierend darauf weiter zu erforschen.

In Menschen und Mäusen hingegen wird die Kombination aus IL-2 und IL-12 häufig genutzt, um NK-Zellen zu stimulieren (238-240). Basierend darauf konnten weitere Versuche mit diesem Zelltyp gemacht werden, wie der Untersuchung des Effekts der beiden Zytokine auf die CXCR3-Expression von NK-Zellen (342), oder der IL-2/IL-12-induzierten Aktivierung invarianter NK T-Zellen zur Sekretion verschiedener Zytokine und Hochregulation der Perforin-Expression (343).

Betrachtet man die Zytokine IL-2 und IL-12 jeweils alleine und vergleichend mit ihrer Kombination, fällt auf, dass sie im richtigen Verhältnis zueinander einen stärkeren Effekt ausüben als alleine. So beobachteten Ueta et al. (189), dass eine zusätzliche Gabe von IL-2 den Effekt des IL-12 auf die  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation verstärkte. Gately et al. (242) demonstrierten, dass IL-12 alleine zu einer Proliferation aktivierter T-Zellen führte, aber nur in einem geringeren Ausmaß als IL-2 alleine. In einer anderen Studie führte IL-12 in allen Dosen zu Proliferation und zytotoxischer Aktivität aktivierter humaner CD8+ T-Zellen, isoliert aus Blut. In Kombination mit niedrigen Dosen IL-2, beide zusammen an Tag 1 zu den Zellen gegeben, wurde dieser Effekt verstärkt, in Kombination mit höheren Dosen IL-2 jedoch gehemmt (241). Auch andere Forschungen ergaben einen möglichen konzentrationsabhängigen hemmenden Effekt des IL-12 auf die Proliferation von NK-Zellen (344) oder  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen (345), wenn diese zusätzlich mit IL-2 stimuliert wurden. Dies spricht wiederum für die unbedingte Notwendigkeit der Ermittlung optimaler Verdünnungen von IL-2 und IL-12, um nicht den gegenteiligen Effekt zu erreichen als eigentlich gewünscht.

Beim Huhn wurde ebenfalls gezeigt, dass diese Zytokin-Kombination einen synergistischen Effekt auf  $\gamma\delta$  T-Zellen hat, im Vergleich zu IL-2 oder IL-12 alleine. IL-12 selbst war nämlich nicht in der Lage, die zytotoxische Fähigkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu induzieren, die Kombination der

beiden jedoch schon. Sie führte zu starken zytotoxischen Effektorfunktionen (281). Auch unsere BrdU-Proliferationsassay-Ergebnisse zeigten einen verstärkten Effekt der beiden Zytokine zusammen auf die Proliferationskapazität von Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen. IL-12 alleine förderte die Proliferation nur schwach, IL-2 alleine erhöhte sie schon deutlich, die Kombination der beiden führte schließlich zum größten Effekt auf die Proliferationskapazität. Betrachtet man Figure 1 (346), sieht man die Effekte der Zytokine in ihrer jeweiligen Verdünnung auf die  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation anhand der gemessenen Proliferationsindices im BrdU-Proliferationsassay.

Warum führt die Kombination aus den beiden Zytokinen IL-2 und IL-12 beim Huhn zum selektiven Wachstum von  $\gamma\delta$  T-Zellen und nicht zu dem von  $\alpha\beta$  T-Zellen? IL-2 alleine stimuliert als T-Zell-Wachstumsfaktor sowohl  $\gamma\delta$  als auch  $\alpha\beta$  T-Zellen. Bei IL-12 verhält sich das jedoch anders. Ueta et al. (189) haben gezeigt, dass IL-12 im Menschen zwar einen stimulierenden Effekt auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut hatte, aber nicht auf  $\alpha\beta$  T-Zellen. Gemessen wurde die Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen anhand der Oberflächenexpression von CD25. Sie stellten die Vermutung an, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen eine höhere Zahl an funktionalem IL-12R auf ihrer Oberfläche exprimieren als  $\alpha\beta$  T-Zellen. Yang et al. (197) stellten fest, dass sowohl IL-12 als auch IL-2 zusammen mit HMBPP zur Expansion eines spezifischen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subtyps führten, nämlich V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 (eigentlich V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 genannt).

Kasahara et al. (127) beobachteten bei anderen Zellkultursystemen mit Hühnerzellen, dass  $\alpha\beta$  T-Zellen im Lauf der Stimulation von den proliferierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen überwachsen wurden. Auch in diesen Systemen wurde unter anderem IL-2 zur Stimulation genutzt. Aber auch bezüglich der Wirkung von IL-2 auf Hühner-T-Zellen konnten Choi et al. (282) nach der Injektion von IL-2-DNA in junge Hühner einen deutlicheren Effekt auf CD8+  $\gamma\delta$  T-Zellen feststellen als auf  $\alpha\beta$  T-Zellen, nämlich anhand einer gestiegenen Prozentzahl von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz. In vorherigen Experimenten konnten wir zeigen, dass IL-2 vorzugshalber CD8+ Zellen in 6-Tages-Kulturen stimulierte, während IL-18 das Wachstum von CD4+ Zellen förderte (292), der TCR-Phänotyp dieser Zellen wurde jedoch nicht weiter analysiert. Dahingehend kann man also nur Vermutungen anstellen, ob die durch IL-2 bevorzugt stimulierten CD8+ Zellen zu einem größeren Teil den  $\gamma\delta$  T-Zellen angehörten oder nicht.

Ein selektives Wachstum von  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde auch schon in verschiedenen anderen Stimulationsprotokollen von Menschen, Mäusen, Schweinen und auch Hühnern gezeigt. Rajasekar et al. (235) beobachteten eine Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen durch hohe Dosen Ionomycin. Behr et al. (214) stimulierten eine spezifische  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2) in Blut-Lymphozyten mit Bestandteilen von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger von *Malaria tropica*, Domae et al. (234) konnten diese Subpopulation ebenfalls stimulieren, und zwar mithilfe von IL-12 und IL-18, aber erst nach ihrer Aktivierung durch IL-2 und Zoledronsäure. Lynch et al. (236) folgerten aus verschiedenen Stimulationsversuchen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus sowohl auf eine Kombination aus Zytokinen wie IL-2 + IL-7 oder IL-2 + IL-1 mit Proliferation reagierten als auch auf eine Kombination aus TCR-Crosslinking und Zytokinen, aber nicht auf TCR-Crosslinking alleine. Sedlak et al. (237) stellten fest, dass Schweine- $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut durch die Kombination aus verschiedenen Zytokinen wie IL-2, IL-12 oder IL-18 mit ConA proliferierten.

Kasahara et al. (127) führten die ersten Versuche durch, Hühner-γδ T-Zellen zu stimulieren, wofür unter anderem mit einer Kombination aus dem Lektin ConA und löslichen exogenen Wachstumsfaktoren, gewonnen aus dem Überstand von mit ConA stimulierten Milzzellen, oder mit der Kombination aus anti-CD3 Antikörpern und dem ConA-Überstand gearbeitet wurde. Alleine mit ConA oder anti-CD3 proliferierten sie nur schwach. Damit wurde gezeigt,

dass  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation durch eine Kombination aus Rezeptorligation und Zytokinenthaltendem Zellkulturüberstand erreicht werden kann, diese Zellen also nicht alleine proliferieren können, sondern die Hilfe anderer Zellen, vermutlich der  $\alpha\beta$  T-Zellen brauchen. Zusätzlich konnte durch die Nutzung eines anti-IL-2R-Antikörpers und der infolgedessen ausbleibenden Proliferation nachgewiesen werden, dass ein wichtiger im Zellkulturüberstand enthaltener exogener Wachstumsfaktor für die  $\gamma\delta$  T-Zellen IL-2 sein musste.

Choi et al. (282) beschrieben ein Kultursystem für Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen, dass mithilfe einer Kombination aus IL-2 und ConA betrieben wurde.

Diese Studien sprechen alle zusammen für die Notwendigkeit einer dualen Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen entweder durch TCR-Crosslinking in Kombination mit einem Zytokin oder durch zwei Zytokine, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird.

Möglicherweise induziert die Lektinstimulation in der Milzzell-Kultur Bystander-Zellen dazu, IL-12 zu sezernieren. Mögliche Bystander-Zellen wären die  $\alpha\beta$  T-Zellen, deren Aktivierung zur Produktion von IL-2 führen könnte. Van der Heyde et al. (243) entdeckten eine Abhängigkeit der Expansion von γδ T-Zellen nach Malaria-Infektion bei Mäusen von CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen, Pechhold et al. (215) sahen, dass Blut-γδ T-Zellen CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen des T<sub>H</sub>1-Typs für die Proliferation nach Aktivierung durch M. tubercolis benötigten.

Wir vermuten, dass IL-2 oder TCR-Crosslinking für die Hochregulation des IL-12-Rezeptors auf  $\gamma\delta$  T-Zellen essenziell sind. Aufgrund des Mangels an einem Reagenz, um den Hühner-IL-12-Rezeptor zu detektieren, konnten wir dies leider nicht untersuchen. Diese Annahme bekräftigt die Studie von Wang et al. (240) bezüglich NK-Zellen des Menschen. Hier führte eine Stimulation von NK-Zellen mit IL-2 zu einer Hochregulation der IL-12R-Expression und auch der Hochregulation und Aufrechterhaltung der Expression von STAT4, wichtig für das IL-12-Signaling in NK-Zellen, was beides zu einem besseren Ansprechen der Zellen auf IL-12 führte. Ueta et al. (189) zeigten, dass humane  $\gamma\delta$  T-Zellen, nach Stimulation mit IL-12, CD25, also den IL-2R, exprimierten und daraufhin nach IL-2-Zugabe sehr gut proliferierten.

Also führen die beiden Zytokine möglicherweise gegenseitig zu einer Hochregulation ihrer Rezeptoren, was für ihren synergistischen Effekt sprechen würde. Ein solches Zusammenspiel wurde schon bei anderen Zytokin-Kombinationen entdeckt, wie bei IL-4 und IL-12 (347).

Die Tatsache, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen auch Antigen-unabhängig, also rein durch Zytokine, aktiviert werden können und proliferieren, weist wiederum auf die Annahme hin, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht nur Rollen im adaptiven Immunsystem, sondern auch im angeborenen Immunsystem innehaben, wie es auch Ribeiro et al. (185) bezüglich des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+ T-Zell-Subtyps des Menschen darstellten. Auch die Beobachtungen von Ueta et al. (189) zeigten die Rolle der  $\gamma\delta$  T-Zellen im angeborenen Immunsystem auf, und zwar konnten  $\gamma\delta$  T-Zellen Antigenunspezifisch durch lösliche Faktoren aktiviert werden, wie IL-12 und TNF- $\alpha$ , die beide von Phagozyten als Reaktion auf Mykobakterien gebildet wurden. Das heißt,  $\gamma\delta$  T-Zellen können vermutlich ohne TCR-Bindung durch Zytokine aktiviert werden und proliferieren, wodurch sie dann schneller auf Pathogene reagieren.

Interessanterweise stellten Berndt et al. (295) ein PBL-Kultursystem vor, in welchem IL-2 in Kombination mit PMA für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation beim Huhn genutzt wurde. PMA wird häufig zusammen mit Ionomycin für die T-Zell-Stimulation angewandt (348,349), so auch beim Schwein zur  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimulation (184). PMA führt zur Aktivierung der Proteinkinase C, einem Enzym mit Schlüsselrolle im Signaling der Immunzellen (350).

Wir hingegen konnten keine Proliferation von Blut- $\gamma\delta$  T-Zellen oder IELs durch die IL-2-/IL-12-Costimulation erreichen. Diese Differenzen könnten entweder in der Nutzung verschiedener

Hühnerlinien oder vermutlich eher in der PMA versus IL-12 Stimulation begründet sein. Möglicherweise können Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen in Blut oder Darm nur eine geringere Dichte an IL-12-Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufweisen, verglichen mit  $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz, was für diese mangelnde Proliferation sprechen könnte. Auch hierfür wäre ein Reagenz zur Detektion des Hühner-IL-12-Rezeptors hilfreich. Im Vergleich dazu sprechen Blut- $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen durchaus auf eine IL-2-/IL-12-Costimulation an (189) und es scheint auf jeden Fall PBMCs mit einem funktionalen IL-12R zu geben (351).

Als Bestandteil zukünftiger Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen unter der IL-2-/IL-12-Costimulation Zytokine produzieren, wie beispielsweise IFN- $\gamma$ . Diese Effektorfunktion wurde in anderen Spezies, wie Schwein (237) und Rind (249), beschrieben, in welchen mit unter anderem IL-2-/IL-12-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen IFN- $\gamma$  produzierten. Nämlich zeigten Sedlak et al. (237), dass aufgereinigte  $\gamma\delta$  T-Zellen des Schweins nach Stimulation mit IL-2 und IL-12 IFN- $\gamma$  produzierten, aber nur mäßige Proliferation zeigten. Die Produktion des IFN- $\gamma$  konnte durch Zugabe von IL-18 noch erhöht werden. Price et al. (249) beschrieben, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen im Rind nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 IFN- $\gamma$  produzierten. So auch  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen der Maus, die durch die resultierende IFN- $\gamma$  Produktion vor einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* geschützt wurden (221).  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen aus humanem Blut produzierten nach Stimulation mit IL-12, unter anderem zusammen mit IL-2, IFN- $\gamma$  (198), und auch Chan et al. (250) zeigten, dass IL-12 zur IFN- $\gamma$  Produktion humaner PBLs und von Mäuse-Milzzellen beitrug.

Zusätzlich zur IFN- $\gamma$  Produktion sezernierten aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen aus menschlichem Blut, nach Stimulation mit IL-2 und IL-12 oder IL-2 und IL-12 und IL-18, TNF- $\alpha$  und IL-17 (251). Auch die mit HMBPP + IL-12 stimulierbaren V $\gamma$ 2V $\delta$ 2+ T-Zellen, wie von Yang et al. (197) demonstriert, produzierten neben IFN- $\gamma$  unter anderem TNF- $\alpha$  und GM-CSF. Bezüglich dieser  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation bei Menschen zeigten auch Domae et al. (234) eine Antigenunabhängige IFN- $\gamma$  Produktion durch Stimulation mit IL-12 und IL-18. Eine Stimulation mit IL-12 und IL-18 mit IL-12 und IL-18.

Das beim Säuger für die IFN- $\gamma$  Produktion wichtige Zytokin, das IL-18 (IFN- $\gamma$  inducing factor), ist auch beim Huhn schon bekannt und kann beispielsweise in primären Milzzell-Kulturen die IFN- $\gamma$  Produktion anregen (298), oder zur Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz führen (292).

Somit bleibt herauszufinden, wie sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Huhns verhalten, auch beim Vergleich einer IL-2/IL-12-Costimulation mit einer zusätzlichen Gabe von IL-18. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut nach einer MDV-Infektion oder MDV-Vakzinierung ebenfalls IFN- $\gamma$  produzieren können (274,283). Man weiß, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen unter einer anderen Stimulation IFN- $\gamma$  produzieren können, wie mit TCR1-mAK stimulierte PBMCs (283) oder CD8+  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Infektion mit *Salmonella Typhimurium* (284). Zusätzlich dazu wäre es auch wichtig zu überprüfen, ob die mit IL-2/IL-12 stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen des Huhns, sofern sie Zytokine produzieren, dies auch über den gesamten Zeitraum der Stimulation tun, also bis zu 21 Tage, oder nur begrenzt. Wang et al. (240) demonstrierten nämlich, dass NK-Zellen unter der Stimulation von IL-2 und IL-12 vermehrt IFN- $\gamma$  produzierten, aber nur zu Beginn der Stimulation, und zwar hauptsächlich in den ersten 24 Stunden in Kultur.

Während der Etablierung des *in vitro*-Kultursystems haben wir Variablen entdeckt, die die Entwicklung der Zellen in Kultur beeinflussen. Durchflusszytometrische Messungen der präparierten totalen Milzzellen zeigten an Tag 0 eine Spanne von 15-60% an TCR1<sup>+</sup> Zellen bei Tieren unterschiedlichen Geschlechts und Alters. Dies stimmt zum Teil mit früheren Studien

überein, welche eine Spanne zwischen 20 und 30% beobachteten (8,127). Die Prozentzahl an TCR1 $^+$  Zellen an Tag 0 variierte zwischen männlichen und weiblichen Tieren mit 15 bis 25% in Weibchen und 30 bis 60% in Männchen (Supplemental Figure 10A) (346). Von einer Androgeninduzierten Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Blut und Milz männlicher Tiere in einem Alter zwischen 4 und 6 Monaten wurde schon berichtet, bei Weibchen war ein solcher Anstieg im Alter nicht zu sehen (269). Auch bei unseren Daten zeigten weibliche Tiere eine deutlich geringere  $\gamma\delta$  T-Zell-Frequenz in der Milz als männliche Tiere. Aber wir beobachteten teilweise nur einen geringen Anstieg der  $\gamma\delta$  T-Zell-Frequenz beim Vergleich jüngerer und älterer männlicher Tiere.

Die Proliferationskapazitäten der von männlichen und weiblichen Tieren abstammenden Milzzellen waren identisch, beide proliferierten bis zu 21 Tage lang und konnten in dieser Zeit gleichermaßen für Versuche genutzt werden. Das Alter der untersuchten Hühner hatte jedoch einen Effekt auf das Ergebnis der Kultur. Milzzellen von Tieren älter als 4 Monate starteten 2-4 Tage früher mit der Proliferation (Supplemental Figure 10B) (346), und auch zuverlässiger, als Milzzellen jüngerer Tiere. Dies könnte zum einen mit der zum Teil höheren  $\gamma\delta$  T-Zell-Frequenz in der Milz älterer Tiere, zumindest bei Männchen, zusammenhängen oder auch mit der Reaktivität der Zellen auf die Zytokine IL-2 und IL-12, vielleicht bezüglich einer stärkeren Hochregulation des IL-2R und IL-12R im Alter.

#### 6.2 Verschiedene γδ T-Zell-Populationen reagieren auf Zytokinstimulation

Durchflusszytometrische Messungen der mit IL-2 und IL-12 costimulierten Hühner-Milzzellen mit einem  $\gamma\delta$  TCR-Antikörper und einem CD8-Antikörper zeigten ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Subpopulationen über die Zeit von Tag 0 bis Tag 21 auf (Figure 2A) (346): die TCR1-CD8- Zellen verschwanden fast komplett, die Zahl der TCR1-CD8+ Zellen nahm ab und die TCR1+CD8- Zellen blieben im selben Frequenzbereich erhalten, während die Frequenz der TCR1+CD8+ Zellen anstieg. Die TCR1+CD8- Zellen konnte man zusätzlich anhand der Expressionsstärke ihres  $\gamma\delta$  TCRs in zwei Subpopulationen einteilen. Die CD8-Expression schauten wir uns an, da  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz zu einem großen Teil, bis zu 80%, CD8+ waren, was implizierte, dass es essenziell für die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen beim Huhn ist. Dies stimmt mit älteren Studien überein, die zudem beobachteten, dass die CD8-Expression im Blut deutlich geringer ist (127). Beim Mensch exprimieren fast 50% der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz CD8, im Blut nur bis zu 30% (124). CD8 dient zum einen als Corezeptor des TCRs bezüglich der Antigenerkennung (122), zum anderen unterstützt es die T-Zellaktivierung (129,130).

Um die IL-2- und IL-12-responsiven Zellen weiter zu charakterisieren, führten wir Sort-Experimente dreier Subpopulationen (TCR1+CD8+, TCR1highCD8-, TCR1lowCD8-) durch, basierend auf  $\gamma\delta$  TCR- und CD8-Expression (Figure 3A) (346). Mit diesen Experimenten wollten wir folgende Fragen beantworten: Erstens, ist die Proliferation abhängig von Bystander-Zellen? Zweitens, bestimmt nur einer der Phänotypen die Proliferationskapazität? Und drittens, bleiben die verschiedenen Phänotypen in Zellkultur stabil? Da wir zuvor totale Milzzellen für unsere Versuche genutzt haben, konnten wir nicht ausschließen, dass zusätzliche Faktoren, wie die co-kultivierten Zellen, Einfluss auf die Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen haben. Unsere Hypothese für die gesorteten Subpopulationen war, dass nur die CD8+ Zellen proliferieren werden, und dass die TCR1highCD8- Zellen auf die Stimulation mit einer Hochregulation von CD8 reagieren könnten. Ähnliches beobachteten nämlich Kasahara et al. (127). Negativ-gesortete CD8+ Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen, im Forward Scatter größer als die CD8-  $\gamma\delta$  T-Zellen, reagierten mit deutlicher Proliferation auf eine Stimulation mit anti-CD3 in Kombination mit exogenen Wachstumsfaktoren, sehr wahrscheinlich IL-2, CD8- Hühner- $\gamma\delta$  T-

Zellen reagierten jedoch nicht. Zusätzlich stellten sie fest, dass nahezu alle proliferierenden γδ T-Zellen nach ein paar Tagen in Kultur CD8<sup>+</sup> waren.

Auch die Versuche von Pieper et al. (284) zeigten die Tendenz, dass nach Infektion mit Salmonella Typhimurium nur die CD8<sup>+</sup> γδ T-Zellen stimuliert wurden, aber nicht die CD8<sup>-</sup>.

Unsere Experimente zeigten jedoch, dass alle drei Subpopulationen in den getesteten Tieren deutlich proliferierten, und zwar mit keinem Unterschied zwischen CD8- und CD8+ Zellen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass keine anderen Zellen in Kultur benötigt werden, weder für zusätzliche Zytokinsekretion noch für Stimulation durch Zell-Zell-Kontakt. Da alle TCR-Subpopulationen proliferierten (Figure 3B) (346), konnte auch die zweite Frage über die Limitierung der Proliferationskapazität durch die Reaktivität nur eines Subtyps auf die beiden Zytokine verneint werden. Der Phänotyp bezüglich der CD8-Expression blieb über die Zeit der Proliferation nicht stabil; im Durchschnitt regulierte ein Drittel der TCR1<sup>high</sup>CD8- Zellen CD8 nach 7 Tagen hoch, bei den TCR1<sup>low</sup>CD8- Zellen war dies auch sichtbar, aber in deutlich geringerem Ausmaß (im Durchschnitt 8%). Der Phänotyp der doppeltpositiven Zellen blieb hingegen stabil (Figure 3C und D) (346).

Der Unterschied zu Kasahara et al. (127), bei dem nur die CD8 $^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen reagierten, könnte im anderen Stimulationsprotokoll begründet liegen, nämlich der Kombination aus anti-CD3 und IL-2. Aufgrund dieses  $\gamma\delta$  TCR-Crosslinking über anti-CD3 wird vermutlich auch der TCR-Corezeptor CD8 angesprochen, der dann über die Verknüpfung mit der Tyrosinkinase Lck die Signaltransduktion unterstützt.

Wir hingegen nutzten eine Kombination aus IL- 2 und IL-12, arbeiteten also nicht über TCR-Crosslinking, und erreichten eventuell deswegen eine zuerst von CD8 unabhängige Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Allgemein schließen wir aus unseren Beobachtungen, dass die  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimulation mit IL-2 und IL-12 zur Expression von CD8 führte, und dass die TCR-Dichte möglicherweise ein Zeichen für die vorherige Aktivierung ist, weshalb vor allem die Subpopulationen mit einer höheren TCR-Dichte, also die TCR1+CD8+ und die TCR1highCD8- Zellen, im Lauf der Stimulation vermehrt CD8 exprimierten bzw. hochregulierten. Daher wäre es besonders wichtig zu untersuchen, ob wirklich ein Zusammenhang zwischen Zytokinproduktion, wie hier IL-2 und IL-12, oder auch anderer Zytokine, und der CD8-Expression in Hühnern besteht.

Es ist schon bekannt, dass die Stimulation mit IL-2 beim Huhn hauptsächlich zur Stimulation CD8+ Zellen führt (292). Auch beim Menschen ist IL-2 essenziell für die Expansion aktivierter CD8+ T-Zellen (246). MacDonald et al. zeigten eine Expansion CD3+CD8+ Thymozyten der Maus nach Stimulation mit IL-2 und ConA (352) und ein paar Jahre später, dass ein Teil der doppeltnegativen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach dieser Stimulation CD8 exprimierte (244). Spetz et al. (353) bestätigten dies, bei Mäusen führte die Stimulation doppeltnegativer Thymozyten mit ConA oder anti-CD3 und IL-2 *in vitro* zur Differenzierung in CD8+  $\gamma\delta$  T-Zellen. Dies trat aber nur ein, sofern  $\alpha\beta$  T-Zellen in der initialen Population enthalten waren. Cron et al. (245) zeigten eine Hochregulation von CD8 auf doppeltnegativen Mäuse- $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz nach 7-tägiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2. Auch beim Schwein vermuteten Sinkora et al. (354) eine stimulationsbedingte Expression von CD8 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen, und Laursen et al. (274) konnten einen Anstieg CD8+  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Hühnermilz nach Infektion mit MDV feststellen.

Aufgrund dieses in unseren Studien beobachteten CD8-Verhaltens wäre es interessant herauszufinden, ob nur bestimmte  $\gamma\delta$  T-Zell-Subtypen CD8 exprimieren können. Dies könnte man möglicherweise durch Next Generation Sequencing gesorteter CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen

und einem erneuten Sort und der Sequenzierung der CD8 $^{-}$  Zellen, die nach 7 Tagen in Kultur mit IL-2 und IL-12 CD8 $^{+}$  geworden sind, herausfinden, und zwar anhand von Übereinstimmungen in den genutzten V $\gamma$ - und V $\delta$ -Sequenzen.

Auch Infektionen führten zu einem Anstieg CD8 $^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen beim Huhn. So zeigten Studien mit *Salmonella typhimurium* von Berndt et al. (275,276) einen Anstieg der CD8 $^+$ TCR1 $^+$ Zellen. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen bezüglich der Expansion CD8 $^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen nach Aktivierung überein. Da wir aber keine Informationen zum initialen CD8-Status dieser Zellen haben, können wir daraus keine Schlüsse über eine Änderung des CD8-Phänotyps der expandierenden Zellen ziehen. Einen Hinweis lieferte aber die geringere Zahl CD8 $^ \gamma\delta$  T-Zellen nach Infektion in der Peripherie, eine mögliche Erklärung könnte die Hochregulation der CD8-Expression sein, aber auch eine Abwanderung dieser Zellen zu Infektionsherden in Geweben (275).

## 6.3 Zytokinstimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen führt zu einem eingeschränkten TCR-Repertoire

Im nächsten Schritt unserer Studie nutzten wir den Vorteil eines kürzlich in unserem Labor entwickelten Protokolls für TCR-Profiling (15). Dieses basiert auf 5' RACE (355) mit einem Primer spezifisch für die konstante C-Region, in unserer Arbeit für  $\gamma$  und  $\delta$ , und einem Template-switch Oligonukleotid, einschließlich Unique Molecular Identifier (UMI), am 5' Ende. Amplikons variabler Regionen der TCRs werden durch zwei erfolgreiche Runden von seminested PCRs generiert, die auf der cDNA durchgeführt werden, und zwar mithilfe von Primern spezifisch für das Template-switch Oligonukleotid und für die konstante C-Region (Supplemental Figure 2 und Suppl. Tables 1-3) (346). Die Produkte werden schließlich durch Illumina-Sequenzierung analysiert. Dadurch kann die gesamte Diversität der variablen Region vervielfältigt werden. Angelehnt wurde das Protokoll an zwei etablierte Systeme für das TCR-Profiling, einmal für den Menschen (300) und einmal für die Rötelmaus (301), und schließlich für das Huhn angepasst. Mamedov et al. (300) nutzten ein spezifisches Oligonukleotid für die cDNA-Synthese, das durch Template-Switching einen Adapter am 5' Ende erzeugt und einen Barcode, wie das UMI, enthält. Die anschließende PCR war eine Kombination aus step-out PCR am 5' Ende (355) und nested PCR am 3' Ende (356,357). Dieses Protokoll ist unter anderem auf eine anschließende Illumina-Sequenzierung ausgelegt, die auch bei uns in Anspruch genommen wurde. Migalska et al. (301) orientierten sich auch an dem von Mamedov et al. (300) etablierten Protokoll und adaptierten es für das TCR-Profiling der  $\alpha\beta$  T-Zellen von der Rötelmaus. Auch für das Schwein wurde ein auf NGS basierendes TCR-Profiling-Protokoll mit 5' RACE für γδ T-Zellen entwickelt (302).

Warum bieten UMIs Vorteile? Es handelt sich um Barcodes bestehend aus Random Oligonukleotiden, in unserem Fall aus 12 Nukleotiden. Durch UMIs kann unterschieden werden, ob identische Sequenzen von verschiedenen Molekülen abstammen oder durch PCR-Amplifikation desselben Moleküls entstanden, also PCR-Duplikate sind (358). Aird et al. (359) beschrieben das Problem, dass eine Verzerrung in der PCR-Amplifikation zur Überrepräsentation bestimmter Sequenzen führen kann. Sims et al. (360) schlugen vor, dies durch Entfernen der Reads mit identischen Sequenzen zu verhindern, um somit Fehler in der Quantifizierung zu vermeiden. Das macht für die Daten, bei denen zwei unterschiedliche Moleküle mit gleichem Alignment nicht erwartet werden, durchaus Sinn. Auch die Sequenziertiefe nimmt Einfluss auf diese Verzerrung. Bei unseren Daten wäre das allerdings

wenig sinnvoll, da wir davon ausgingen, dass das Vorkommen identischer Sequenzen physiologisch ist. Das Einführen von UMIs hingegen ermöglichte durch den Einbau an jeweils die gleiche Stelle in jedem Molekül während der cDNA-Synthese, also noch vor den PCR-Zyklen, die wirklichen PCR-Duplikate auszusortieren, da sie die gleichen UMIs zeigten. Sie konnten dadurch schon häufig erfolgreich für NGS genutzt werden (305,306) und der effizienten Korrektur von PCR- und Sequenzierungs-Fehlern dienen (307).

Unsere Experimente wurden mit mRNA, welche an Tag 0 aus der Zellkultur unstimulierter Milzzellen und an Tag 21 aus stimulierten Milzzellen isoliert wurde, durchgeführt. Sie dienten dem Vergleich des genutzten Repertoires zwischen den untersuchten Tieren, und der Analyse, ob vorzugshalber nur ein spezifischer Klonotyp für  $\gamma$  und für  $\delta$  von IL-2 und IL-12 stimuliert wird und somit verantwortlich für die langlebigen Zellen in Kultur ist, oder ob potenzielle am Ende vorhandene dominante Klonotypen eine individuelle Entwicklung nach Stimulation darstellen. In Menschen z.B. führt IL-12 zur Expansion und Differenzierung einer spezifischen aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation, den  $V\gamma 2V\delta 2^+$  Zellen (eigentlich  $V\gamma 9V\delta 2$ ) (197). Dies wurde auch mithilfe einer Kombination aus IL-12 und IL-18 gezeigt (234). Beim Schwein trägt IL-12 in Kombination mit ConA zwar auch zur Proliferation bei, hier wurden aber keine Untersuchungen zum Repertoire angestellt (237).

Eine Änderung des  $\gamma$  und  $\delta$  Repertoires des Huhns wurde in unserer Arbeit bezüglich verschiedener Aspekte beobachtet. Die Langzeitkultur führte zu einer kleineren Anzahl an exprimierten V-Regionen für  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten (Figure 4) (346). An Tag 0 wurden im TCR $\gamma$ -Repertoire im Schnitt 11.000 verschiedene Klonotypen exprimiert, an Tag 21 hingegen nur noch 1.200, und beim TCR $\delta$ -Repertoire wandelte es sich von 10.000 zu 1.300 verschiedenen Klonotypen. Die exprimierten V-Regionen erschienen an Tag 21 in einer höheren Frequenz, bei den Tieren 1 und 2 nahmen  $\gamma$ -Klonotypen, die jeweils über 100-mal gezählt wurden, 75% des Repertoires ein. An Tag 0 waren solch frequente Klonotypen kaum vorhanden (Figure 5A) (346).

Die Verteilung der CDR3-Klonotypen bezüglich ihrer Länge in Aminosäuren (AS) zeigte an Tag 0 eine Normalverteilung, an Tag 21 zeigten sie eine verschobene Verteilung. Beim TCR $\gamma$ -Repertoire wurde diese vom gleichen V $\gamma$ -Gen in allen untersuchten Tieren verursacht, dem TRGV3-5 Gen. Beim TCR $\delta$ -Repertoire hingegen war dafür bei jedem Tier ein anderes V $\delta$ -Gen verantwortlich. Die im Schnitt am häufigsten genutzten CDR3-Längen variierten zwischen 11 und 17 AS (Figure 5B) (346). Die 5 dominanten CDR3-Klonotypen zeigten große Parallelen zwischen den Tieren an Tag 0 für  $\gamma$  (Supplemental Figure 8) (346), aber nicht an Tag 21, und nicht für  $\delta$ . Die dominanten CDR3-Klonotypen an Tag 21 unterschieden sich von denen an Tag 0 (Supplemental Figure 8, dargestellt für gamma) (346).

Die Proliferation in Zellkultur schien also unabhängig von der Frequenz der Klonotypen an Tag 0 zu sein, da die häufigsten Klonotypen an Tag 21 nicht mit denen an Tag 0 übereinstimmten und zwischen den Tieren variierten. Die individuelle Entwicklung verschiedener Kulturen könnte demnach das Ergebnis einer vorherigen *in vivo*-Aktivierung, möglicherweise durch unterschiedliche Antigene, und *in vitro*-Expansion der Zellen durch IL-2 und IL-12 sein. Im Gegensatz zu den anderen war das Repertoire bei Tier 3 nach Stimulation weniger restriktiv. Dieses Tier zeigte interessanterweise die höchste Proliferationskapazität nach drei Wochen in Zellkultur, möglicherweise hatte sich bei diesem der dominante Klon noch nicht vollständig durchgesetzt, oder es gab eine *in vivo*-Aktivierung verschiedener Klonotypen.

Nach Betrachtung der genutzten TRGV- und TRDV-Gene konnten wir feststellen, dass in allen drei Tieren an Tag 0 drei V $\gamma$ -Segmente zusammen am häufigsten genutzt wurden (TRGV2-26, TRGV3-5 und TRGV3-6), sie nahmen zusammen über 40% des Repertoires ein, TRGV2-26 besetzte um die 18%. Das häufigste V $\gamma$ -Gensegment drei Wochen nach Stimulation war allerdings in allen Tieren das gleiche (TRGV3-5), es beanspruchte 30-70% des Repertoires (Figure 6A) (346). Bei  $\delta$  sah das anders aus, an Tag 0 wurde nämlich TRDV1-2 von allen Tieren hauptsächlich genutzt und nahm bis zu ca. 18% des Repertoires ein, an Tag 21 zeigte jedes Tier ein anderes TRDV-Gen am häufigsten (TRDV1-17, TRDV1-9, TRDV1-37), die Beanspruchung des Repertoires variierte zwischen 15 und 55% (Figure 6B) (346). Bezüglich der TRGJ- und TRDJ-Gene waren TRGJ3 und TRDJ1 die meist genutzten (Supplemental Figure 9) (346).

Bisher gibt es nur wenige Analysen des TCR-Repertoires im Huhn, und zwar nur zwei zum TCRγ. Dixon et al (12) nutzten in ihrer Studie als Referenzgenom das von Liu et al. (82) veröffentlichte Genom des Red Jungle Fowl und bauten diese Annotation weiter aus. Auch sie nutzten 5'RACE zur Vervielfältigung ihrer Proben aus mehreren Geweben, und beobachteten, dass das TCRγ-Repertoire des Huhns aus vielen, zwischen den Tieren geteilten, öffentlichen, aber überwiegend aus privaten CDR3-Sequenzen besteht, 80-100% waren nämlich nur in einzelnen Individuen zu sehen. Die höchste Diversität fanden sie im Thymus. Die Nutzung der TRGV-Gene war aber allgemein in Thymus, Milz und Darm sehr ähnlich. Das TRGV3.3-Gen wies ein hoch diverses privates CDR3-Repertoire auf. Nur ca. 10% des Repertoires waren öffentlich. Dieses Gen dominierte jedes untersuchte Gewebe in allen Hühnern, es nahm 30-40% des gesamten Repertoires ein, und kam damit mindestens doppelt so häufig vor wie das am zweithäufigsten genutzte Gen.

Im Gegensatz dazu konnten wir kein solch dominantes TRGV-Gen an Tag 0 identifizieren, bei uns nahmen 3 TRGV-Gene zusammen um die 40% des Repertoires ein.

So wie auch wir bei unseren Daten sehen konnten, stellten Dixon et al. (12) fest, dass die bei mehreren Tieren vorkommenden identischen CDR3-Klonotypen verschiedene TRGV-Gene nutzten. Die variable Nutzung der TRGV-Gene in verschiedenen Geweben unterscheidet sich von der Verteilung der TRGV-Gene im Säuger, wie Mensch und Maus, bei denen diese Gene oft gewebespezifisch vorkommen.

Allgemein wurden neben TRGV3.3 alle Gene aus der TRGV3-Gruppe häufiger genutzt, die Gene aus der TRGV1 und -2 Gruppe zeigten jeweils nur ein Mitglied, das deutlich höher exprimiert wurde.

Unsere Daten zeigten auch eine hauptsächliche Nutzung der Gene aus der TRGV3-Familie, aber außer dem sehr häufig genutzten TRGV2-26 Gen aus der TRGV2-Familie nahm sonst kein Gen deutlich mehr Platz ein als die anderen.

Zhang et al. (13) untersuchten das TCRγ-Repertoire im Thymus mithilfe von NGS. Die Proben vervielfältigten sie ebenfalls mit 5'RACE und als Referenzgenom nutzten sie das zu diesem Zeitpunkt aktuellste Red Jungle Fowl-Genom GRCG6a. Die untersuchten Hühner zeigten ein ähnliches TCRγ-Repertoire, 4 Vγ-Gene und 6 VγJγ-Paarungen wurden hauptsächlich genutzt. Vγ3.7 nahm dabei 20,58% des exprimierten Vγ-Repertoires ein, dicht gefolgt von Vγ2.13 und Vγ1.6, und die 6 häufigsten Paare beanspruchten 44% des gesamten Repertoires.

Dies ähnelt unseren Daten in der Milz. Betrachten wir die 4 häufigsten Vγ-Gene, nahmen diese um die 50% des Repertoires ein, das häufigste (TRGV2-26) beanspruchte um die 18%.

Die CDR3 $\gamma$ -Sequenz zeigte bei Zhang et al. (13) im Durchschnitt eine Länge von 12,9 AS, länger als die von Maus und Mensch (328,361), bei uns lag die am häufigsten vorkommende CDR3-Länge an Tag 0 bei 15 AS für  $\gamma$ .

Allgemein stellten sie fest, dass TCRy höher in Thymus und Milz exprimiert wird als in unter anderem der Lunge.

Somit konnten wir einige Übereinstimmungen zwischen unseren TCRγ-Analysen und denen von Dixon et al. (12) und Zhang et al. (13) feststellen, die Unterschiede könnten darin begründet sein, dass unterschiedliche Protokolle, Hühnergenomsequenzen und Hühnerlinien für die Analysen genutzt wurden (14,346).

Zusätzlich zum Huhn wurde das  $\gamma\delta$  TCR-Repertoire der weißen Pekingente (108) untersucht. Ergebnisse von qPCRs ergaben, dass TCR $\gamma$  und TCR $\delta$ 1 stark in Thymus und Milz, aber nur wenig in Dickdarm, Lunge und Bursa exprimiert wurden. TCR $\delta$ 2 wurde am stärksten in der Lunge exprimiert, in anderen Geweben nur schwach. Das J $\delta$ 1-Segment nahm, ähnlich wie beim Huhn, 2/3 des J $\delta$ 8 Repertoires ein, die CDR3 $\delta$ -Länge betrug im Schnitt 11,5 AS. V $\gamma$ 1.6 und V $\gamma$ 3.4 trugen beide zu je 20% zum exprimierten V $\gamma$ -Repertoire bei, scheinen also auch mehrere TRGV-Gene häufiger zu nutzen, die CDR3 $\gamma$ -Länge lag im Schnitt bei 8 AS. Die CDR3-Längen sind somit kürzer als beim Huhn, mit CDR3 $\delta$ 8 von 16 AS und CDR3 $\gamma$ 9 von 15 AS.

Nun widmen wir uns der Betrachtung des γδ TCR-Repertoires von Säugern.

Bei Mäusen ist bekannt, dass die Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen in verschiedenen Geweben und auch ihre Effektorfunktionen von einer bestimmten V $\gamma$ -Kette geprägt sind, im Gegensatz zu den Beobachtungen im Huhn. In der Epidermis der Haut befinden sich vor allem V $\gamma$ 5+ T-Zellen in Kombination mit V $\delta$ 1 (123,151,152,315), im Darm V $\gamma$ 7+ T-Zellen, in der Peripherie V $\gamma$ 1+ T-Zellen und in Dermis, Gehirn, Gelenken und Reproduktionstrakt V $\gamma$ 4+ und V $\gamma$ 6+ T-Zellen (140,143,146,154,156,316,362,363).

Auch beim Menschen können  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Nutzung ihrer V-Gene eingeteilt werden (316). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen befinden sich in der Peripherie im Blut und gelten als die Haupt-Subpopulation im Menschen (317,318,323), die durch Bindung von Phosphoantigenen expandieren (364,365), nicht-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen repräsentieren hingegen die dominante  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation in Geweben.

Die fetalen  $V\gamma9V\delta2^+$  T-Zellen zeigen öffentliche CDR3 $\gamma$ -Sequenzen, die in ihrer Länge eingeschränkt sind, so auch die CDR $\delta$ -Sequenzen, diese stimmen aber nur zum Teil zwischen verschiedenen Probanden überein, die anderen sind privat (166).

Adulte  $V\gamma9V\delta2^+$  T-Zellen zeigen vor allem private CDR3 $\delta$ -Sequenzen, und weisen eine Veränderung in den am meisten genutzten J $\delta$ -Genen, nämlich von J $\delta$ 3 zu J $\delta$ 1, auf. Beide nutzen hauptsächlich TRGJP (166,317,323,366,367).  $V\gamma4^+$  Zellen befinden sich im intestinalen Epithel, zeigen öffentliche  $V\gamma4^-$ , aber private  $V\delta1$ -Ketten (320,368,369).  $V\delta1^+$  Zellen expandieren häufig nach Infektionen, wie CMV, diese Zellen sind auch die häufigsten im postnatalen Thymus und präferieren TRGJ1 (321,323,327,328,370).

Bezüglich TRDV werden beim Menschen am häufigsten TRDV1-3 Gene genutzt (92,316,371), beim Huhn vor allem TRDV1-Gene. In der Lunge treten vermehrt  $V\delta 2^+$  T-Zellen auf, nach Infektion mit Tuberkulose hingegen  $V\delta 1^+$  T-Zellen mit verschobenem Repertoire (326).

Parallelen zwischen dem Hühner- $\gamma\delta$  TCR-Repertoire und dem der Säuger sind zum einen die vermehrt öffentliche TRGV-Nutzung im Gegensatz zur eher privaten TRDV-Nutzung und einer allgemein höheren  $\delta$ -Diversität, und zum anderen die Verschiebung des Repertoires nach Infektion bzw. Aktivierung.

Schlussfolgernd kann zu den Daten gesagt werden, dass Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen für ausgedehnte Perioden in Kultur mit IL-2 und IL-12 stimuliert werden können, und dass während dieser

Kultur ein Shift Richtung eines eingeschränkteren Repertoires erfolgt. Die dominanten Klonotypen an Tag 21 scheinen dabei das Ergebnis einer individuellen *in vitro*-Expansion zu sein, möglicherweise abhängig von einer vorherigen *in vivo*-Aktivierung.

Dieses Kultursystem wird in zukünftigen Experimenten für eine Charakterisierung der  $\gamma\delta$  T-Zell-Funktion und auch für die Entdeckung potenzieller  $\gamma\delta$  TCR-Liganden sehr nützlich sein.

ZUSAMMENFASSUNG 63

#### 7 ZUSAMMENFASSUNG

#### Einfluss von Interleukin-2 und Interleukin-12 auf γδ T-Zellen im Haushuhn

Diese Arbeit zeigt die Etablierung eines Langzeitkultursystems für  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Hühnermilz, stimuliert mit den beiden Zytokinen IL-2 und IL-12. Die Milzzellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll gewonnen. Die bestmöglichen Verdünnungen für die Zytokine wurden durch BrdU-Proliferationsassays ermittelt, die sowohl mit frisch isolierten Milzzellen als auch mit aufgetauten kryokonservierten Milzzellen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse für beide Zell-Zustände zeigten dasselbe, nämlich eine deutlich verbesserte Proliferation bei der Kombination der Zytokine mit einer 1:800-Verdünnung für IL-2 und einer 1:80-Verdünnung für IL-12. Diese Verdünnungen wurden dann in allen weiteren Experimenten für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Stimulation verwendet.

Durchflusszytometrische Messungen der isolierten Milzzellen mit einem TCR1-mAK demonstrierten einen geschlechterabhängigen Unterschied der γδ T-Zell-Frequenz. Männliche Tiere wiesen Frequenzen zwischen 30 und 60% auf, weibliche Tiere zwischen 15 und 25%. Das Verhalten in Zellkultur nach Stimulation ergab altersabhängige Unterschiede. Tiere älter als 4 Monate starteten 2-3 Tage früher mit der Proliferation als jüngere Tiere und proliferierten zuverlässiger. Messungen mit TCR1- und CT8-mAKs vor und nach dem Kultivieren (Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21) zeigten einen deutlichen Anstieg der doppeltpositiven Population, die Frequenz der TCR1+CD8- Zellpopulation blieb über die Zeit mehr oder weniger gleich, die TCR1-CD8+ Population nahm ab und die doppeltnegative Population verschwand fast vollständig.

Eine Charakterisierung der doppeltpositiven Population und der TCR1+CD8- Population, unterteilt in TCR1highCD8- und TCR1lowCD8- Zellen, mittels Sort-Versuchen und anschließendem Kultivieren, Durchführen von BrdU-Proliferationsassays und durchflusszytometrischen Messungen ergab folgende Ergebnisse über das Verhalten dieser Populationen in Kultur: alle drei Populationen proliferierten nach Stimulation mit IL-2 und IL-12 im gleichen Ausmaß, keine der Populationen bestimmte also die Proliferationskapazität der γδ T-Zellen, und die Zellen benötigten keine Bystander-Zellen für die Proliferation. Die durchflusszytometrischen Messungen nach 7 Tagen in Kultur zeigten einen stabilen Phänotyp für die doppeltpositive Population, aber eine Änderung im Phänotyp der TCR1+CD8- Zellen. Durchschnittlich ein Drittel der TCR1highCD8- Zellen und nur ein geringer Teil der TCR1lowCD8- Zellen zeigten nämlich einen Shift zu einem CD8+ Phänotyp.

Schließlich wurden TCR-Repertoireanalysen für die  $\gamma$ - und  $\delta$ - Ketten durchgeführt, ermöglicht durch die kürzlich in unserem Labor von Früh et al. (15) erstellte bioinformatische Pipeline und Annotation des Huxu-Hühnergenoms für  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  V-Gensegmente. Die durch NGS erhaltenen Fastq-Files wurden mithilfe der Programme FastQC für die Qualitätskontrolle, MiXCR für das Downsampling und Alignment der Proben, und Immunarch in R für die graphische Darstellung ausgewertet. Der Vergleich des Repertoires für  $\gamma$  und  $\delta$  an Tag 0 und Tag 21 ergab ein deutlich eingeschränkteres Repertoire an Tag 21 für beide Ketten, die vorhandenen Klonotypen an Tag 21 traten dafür in einer sehr viel höheren Frequenz auf als die an Tag 0. Interessant war, dass die frequentesten Klonotypen an Tag 0 des  $\gamma$ -Repertoires zwischen den verschiedenen Tieren sehr ähnlich waren, was an Tag 21 nicht mehr der Fall war.

ZUSAMMENFASSUNG 64

Das an Tag 21 am häufigsten genutzte TRGV-Gen war allerdings das gleiche bei allen Tieren, nämlich TRGV3-5. Dies war anders an Tag 0, hier gehörten mehrere Gene zu den am frequentesten genutzten (TRGV2-26, TRGV3-5 und TRGV3-6). Bei  $\delta$  gab es weder an Tag 0 noch an Tag 21 Übereinstimmungen zwischen den frequentesten Klonotypen der verschiedenen Tiere. Auch das Nutzungsbild der Gene war anders als bei  $\gamma$ . TRDV1-2 wurde von allen Tieren an Tag 0 am häufigsten genutzt, an Tag 21 zeigte jedes Tier ein anderes frequentes Gensegment.

Alle Versuche wurden mit jeweils drei Tieren verschiedenen Alters und Geschlechts durchgeführt. Standardabweichungen wurden berechnet und statistische Tests angewandt, wenn angemessen.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass Hühner- $\gamma\delta$  T-Zellen mithilfe von IL-2 und IL-12 in einem Langzeitkultursystem gut proliferieren und überwiegend CD8 exprimieren. Diese Kulturen könnten somit für zukünftige Experimente genutzt werden, die das Verhalten der  $\gamma\delta$  T-Zellen, auch bezüglich Infektionen, und ihre Liganden ermitteln. IL-2 und IL-12 scheinen die  $\gamma\delta$  T-Zellen direkt zu stimulieren, und ihre Proliferation scheint nicht von der CD8-Expression abhängig zu sein. Die Ergebnisse der TCR-Repertoireanalyse zeigen einen Shift zu einem restriktiveren Repertoire an Tag 21 und deuten auf eine eventuelle *in vivo*-Aktivierung und *in vitro*-Expansion individueller Klonotypen hin.

SUMMARY 65

## 8 SUMMARY

## Effect of Interleukin-2 and Interleukin-12 on chicken $\gamma\delta$ T cells

This work shows the establishment of a long-time culture system for  $\gamma\delta$  T cells out of chicken spleens, stimulated with the two cytokines IL-2 and IL-12. The splenocytes were received through density gradient centrifugation with Ficoll. The optimal cytokine dilutions were determined with the help of BrdU proliferation assays, that were performed with freshly isolated splenocytes and thawed cryopreserved splenocytes. The results showed the same for both conditions, the combination of the two cytokines led to a clearly improved proliferation with a 1:800 IL-2 dilution and a 1:80 IL-12 dilution. These dilutions were used for all further experiments to stimulate  $\gamma\delta$  T cells.

Flow cytometry measurements of the isolated splenocytes with a TCR1 mAb showed a gender-dependent difference in the  $\gamma\delta$  T cell frequency. Male animals had a frequency between 30 and 60%, female animals between 15 and 25%. Their behavior in cell culture after stimulation showed age-dependent differences. Animals older than 4 months started to proliferate 2-3 days earlier than younger animals and proliferated more reliably. Measurements with TCR1 and CT8 mAb before and after cultivation (day 0, day 7, day 14 and day 21) demonstrated a clear increase of the double-positive population, the frequency of the TCR1+CD8- population stayed the same over time, the TCR1-CD8+ population decreased, and the double-negative population nearly disappeared.

A characterization of the double-positive population and the TCR1<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> population, classified in TCR1<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> and TCR1<sup>low</sup>CD8<sup>-</sup> cells, with the help of sorting experiments, cultivation, BrdU proliferation assays, and flow cytometry measurements showed following results with regard to their behavior in cell culture: all three populations proliferated after stimulation with IL-2 and IL-12, none of them determined the proliferation capacity of  $\gamma\delta$  T cells and the cells did not need bystander cells to proliferate. The flow cytometry measurements after 7 days in cell culture demonstrated a stable phenotype for the double-positive population, but a change in the phenotype of the TCR1<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells. There was a shift towards a CD8<sup>+</sup> phenotype of in average a third of the TCR1<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> cells, and of some TCR1<sup>low</sup>CD8<sup>-</sup> cells.

Finally, TCR repertoire analyses for  $\gamma$  and  $\delta$  chains were performed. This was possible with the bioinformatic pipeline recently established in our laboratory and the annotation of the Huxu genome for  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  V gene segments (15). Fastq files, received from NGS, were analyzed with FastQC for quality control, MiXCR for downsampling and alignment of the samples, and Immunarch in R for the graphical representation. Comparison of the  $\gamma$  and  $\delta$  repertoire on day 0 and day 7 revealed a clearly restricted repertoire on day 21 for both chains, clonotypes on day 21 were present in a much higher frequency compared to day 0. Interestingly, the most frequent clonotypes of the  $\gamma$  repertoire on day 0 were very similar between animals, this was not the case on day 21. However, the most frequently used TRGV gene on day 21 was the same in all animals, TRGV3-5. This was different on day 0, three genes were the most frequent ones (TRGV2-26, TRGV3-5, TRGV3-6).  $\delta$  did not show similarities on day 0 or on day 21 between the most frequent clonotypes of the animals. The usage of genes was different to  $\gamma$ , as well. TRDV1-2 was used most frequently by all animals on day 0, on day 21 every animal showed a different most frequent gene segment.

SUMMARY 66

Every experiment was performed with three animals of different age and gender. Standard deviations were calculated, and statistical tests were performed as appropriate.

In summary, based on these data, chicken  $\gamma\delta$  T cells proliferate well with the help of IL-2 and IL-12 in a long-time culture system, and most of them express CD8. These cultures could be used for future experiments that study the behavior of  $\gamma\delta$  T cells and their ligands, for example in context of infections. IL-2 and IL-12 seem to stimulate  $\gamma\delta$  T cells directly, and their proliferation does not seem to be dependent on the CD8 surface expression. The results of the TCR repertoire analysis show a shift towards a restricted repertoire on day 21 and indicate a possible *in vivo* activation and *in vitro* expansion of individual clonotypes.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature. 1988;334(6181):395-402. doi:10.1038/334395a0

- 2. Cooper MD, Chen CL, Bucy RP, Thompson CB. Avian T cell ontogeny. Adv Immunol. 1991;50:87-117. doi:10.1016/s0065-2776(08)60823-8
- 3. Chen CH, Six A, Kubota T, Tsuji S, Kong FK, Göbel TW, et al. T cell receptors and T cell development. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;212:37-53. doi:10.1007/978-3-642-80057-3\_5
- 4. Murphy JB. STUDIES IN TISSUE SPECIFICITY: II. THE ULTIMATE FATE OF MAMMALIAN TISSUE IMPLANTED IN THE CHICK EMBRYO. J Exp Med. 1914;19(2):181-186. doi:10.1084/jem.19.2.181
- 5. Murphy JB. FACTORS OF RESISTANCE TO HETEROPLASTIC TISSUE-GRAFTING: STUDIES IN TISSUE SPECIFICITY. III. J Exp Med. 1914;19(5):513-522. doi:10.1084/jem.19.5.513
- 6. Murphy JB. THE EFFECT OF ADULT CHICKEN ORGAN GRAFTS ON THE CHICK EMBRYO. J Exp Med. 1916;24(1):1-5. doi:10.1084/jem.24.1.1
- 7. Glick B, Chang TS, Jaap RG. The Bursa of Fabricius and Antibody Production. Poultry Science. 1956;35(1):224-225. doi:doi.org/10.3382/ps.0350224
- 8. Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. J Exp Med. 1988;167(2):315-322. doi:10.1084/jem.167.2.315
- 9. Hayday AC. γδ Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. Annual Review of Immunology. 2000;18(1):975-1026. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.975
- 10. Shekhar S, Milling S, Yang X. Migration of γδ T cells in steady-state conditions. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2012;147(1):1-5. doi:10.1016/j.vetimm.2012.03.016
- 11. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. Annu Rev Immunol. 1993;11:637-685. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.003225
- 12. Dixon R, Preston SG, Dascalu S, Flammer PG, Fiddaman SR, McLoughlin K, et al. Repertoire analysis of gammadelta T cells in the chicken enables functional annotation of the genomic region revealing highly variable pan-tissue TCR gamma V gene usage as well as identifying public and private repertoires. BMC Genomics. 2021;22(1):719. doi:10.1186/s12864-021-08036-9
- 13. Zhang T, Li Q, Li X, Kang L, Jiang Y, Sun Y. Characterization of the chicken T cell receptor gamma repertoire by high-throughput sequencing. BMC Genomics. 2021;22(1):683. doi:10.1186/s12864-021-07975-7
- 14. Huang Z, Xu Z, Bai H, Huang Y, Kang N, Ding X, et al. Evolutionary analysis of a complete chicken genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023;120(8):e2216641120. doi:10.1073/pnas.2216641120
- 15. Früh SP, Früh MA, Kaufer BB, Göbel TW. Unraveling the chicken T cell repertoire with enhanced genome annotation. Frontiers in Immunology. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1359169
- 16. Eda M. Origin of the domestic chicken from modern biological and zooarchaeological approaches. Animal Frontiers. 2021;11(3):52-61. doi:10.1093/af/vfab016
- 17. Sawai H, Kim HL, Kuno K, Suzuki S, Gotoh H, Takada M, et al. The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to junglefowls Gallus g. gallus and G. varius. PLoS One. 2010;5(5):e10639. doi:10.1371/journal.pone.0010639
- 18. Lawal RA, Martin SH, Vanmechelen K, Vereijken A, Silva P, Al-Atiyat RM, et al. The wild species genome ancestry of domestic chickens. BMC Biology. 2020;18(1):13. doi:10.1186/s12915-020-0738-1
- 19. Maltby M, Allen M, Best J, Fothergill B, Demarchi B. Counting Roman chickens: Multidisciplinary approaches to human-chicken interactions in Roman Britain. Journal of Archaeological Science: Reports. 2018;19. doi:10.1016/j.jasrep.2017.09.013
- 20. Statistisches Bundesamt (Destatis). Globale Tierhaltung, Fleischproduktion und Fleischkonsum 2023 [Available from: <a href="https://www.destatis.de/DE/Themen/Laender-Regionen/Internationales/Thema/landwirtschaft-fischerei/tierhaltung-fleischkonsum/inhalt.html">https://www.destatis.de/DE/Themen/Laender-Regionen/Internationales/Thema/landwirtschaft-fischerei/tierhaltung-fleischkonsum/inhalt.html</a>. [15.03.2024]

21. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Tierhaltung: Geflügelhaltung 2024 [Available from: https://www.bmel-statistik.de/landwirtschaft/tierhaltung/gefluegelhaltung. [15.03.2024]

- 22. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Versorgungsbilanzen Eier 2024 [Available from: <a href="https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung/versorgungsbilanzen/eier">https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung/versorgungsbilanzen/eier</a>. [15.03.2024]
- 23. Robert Koch-Institut. RKI-Ratgeber: Campylobacter-Enteritis 2018 [Available from: <a href="https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber Campylobacter.html">https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber Campylobacter.html</a>. [18.03.2024]
- 24. Friedrich-Loeffler-Institut. Tierseuchengeschehen: Aviäre Influenza (AI)/Geflügelpest Risikoeinschätzung 2024 [Available from: <a href="https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/aviaere-influenza-ai-gefluegelpest/">https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/aviaere-influenza-ai-gefluegelpest/</a>. [15.03.2024]
- 25. Jenner E. An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in some of the Western Counties of England, particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox: Springfield; 1802.
- 26. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005;18(1):21-25. doi:10.1080/08998280.2005.11928028
- 27. Lakhani S. Early clinical pathologists: Edward Jenner (1749-1823). J Clin Pathol. 1992;45(9):756-758. doi:10.1136/jcp.45.9.756
- 28. Pasteur L. De l'atténuation du choléra des poules. Recueil de Médecine Vétérinaire. 1880:1083-1090.
- 29. Silverstein AM. The lymphocyte in immunology: from James B. Murphy to James L. Gowans. Nature Immunology. 2001;2(7):569-571. doi:10.1038/89706
- 30. Simonsen M. The impact on the developing embryo and newborn animal of adult homologous cells. Acta Pathol Microbiol Scand. 1957;40(6):480-500.
- 31. Szenberg A, Warner NL. Quantitative Aspects of the Simonsen Phenomenon: I. The Role of the Large Lymphocyte: Br J Exp Pathol. 1962 Apr;43(2):123-8.
- 32. Simonsen M. Graft versus host reactions. Their natural history, and applicability as tools of research. Prog Allergy. 1962;6:349-467.
- 33. de la Morena MT, Gatti RA. A History of Bone Marrow Transplantation. Hematology/Oncology Clinics of North America. 2011;25(1):1-15. doi:10.1016/j.hoc.2010.11.001
- 34. Teshima T, Hill GR. The Pathophysiology and Treatment of Graft-Versus-Host Disease: Lessons Learnt From Animal Models. Front Immunol. 2021;12:715424. doi:10.3389/fimmu.2021.715424
- 35. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. HAEMATOPOIETIC CHIMERA IN MAN AFTER ALLOGENIC (HOMOLOGOUS) BONE-MARROW TRANSPLANTATION. (CONTROL OF THE SECONDARY SYNDROME. SPECIFIC TOLERANCE DUE TO THE CHIMERISM). Br Med J. 1963;2(5373):1633-1635. doi:10.1136/bmj.2.5373.1633
- 36. Mathé G, Schwarzenberg L, Amiel JL, Schneider M, Cattan A, Schlumberger JR, et al. Immunogenetic and immunological problems of allogeneic haemopoietic radio-chimaeras in man. Scand J Haematol. 1967;4(3):193-216. doi:10.1111/j.1600-0609.1967.tb01621.x
- 37. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. Transplantation. 1970;9(6):571-587. doi:10.1097/00007890-197006000-00006
- 38. Kaufmann SHE. Immunology's Coming of Age. Front Immunol. 2019;10:684. doi:10.3389/fimmu.2019.00684
- 39. Ribatti D, Porzionato A, Emmi A, De Caro R. The bursa of Hieronymus Fabricius ab Aquapendente: from original iconography to most recent research. Rom J Morphol Embryol. 2020;61(2):583-585. doi:10.47162/rjme.61.2.31
- 40. Roitt IM, Torrigiani G, Greaves MF, Brostoff J, Playfair JHL. THE CELLULAR BASIS OF IMMUNOLOGICAL RESPONSES: A Synthesis of Some Current Views. The Lancet. 1969;294(7616):367-371. doi:10.1016/S0140-6736(69)92712-3
- 41. Szenberg A, Warner NL. Immunological Function of Thymus and Bursa of Fabricius: Dissociation of Immunological Responsiveness in Fowls with a Hormonally Arrested Development of Lymphoid Tissues. Nature. 1962;194(4824):146-147. doi:10.1038/194146b0

42. Warner NL, Szenberg A, Burnet FM. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness. Aust J Exp Biol Med Sci. 1962;40:373-387. doi:10.1038/icb.1962.42

- 43. Warner NL, Szenberg A. Effect of Neonatal Thymectomy on the Immune Response in the Chicken. Nature. 1962;196(4856):784-785. doi:10.1038/196784a0
- 44. Burnet FM, Holmes MC. Immunological function of thymus and bursa of Fabricius. Thymus lesions in an auto-immune disease of mice. Nature. 1962;194:146-147. doi:10.1038/194146a0
- 45. Cooper MD, Peterson RD, Good RA. DELINEATION OF THE THYMIC AND BURSAL LYMPHOID SYSTEMS IN THE CHICKEN. Nature. 1965;205:143-146. doi:10.1038/205143a0
- 46. Ryser JE, Vassalli P. Mouse bone marrow lymphocytes and their differentiation. J Immunol. 1974;113(3):719-728.
- 47. Cooper MD. The early history of B cells. Nature Reviews Immunology. 2015;15(3):191-197. doi:10.1038/nri3801
- 48. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957;147(927):258-267. doi:10.1098/rspb.1957.0048
- 49. Witter RL. Increased Virulence of Marek's Disease Virus Field Isolates. Avian Diseases. 1997;41(1):149-163. doi:10.2307/1592455
- 50. Read AF, Baigent SJ, Powers C, Kgosana LB, Blackwell L, Smith LP, et al. Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. PLoS Biol. 2015;13(7):e1002198. doi:10.1371/journal.pbio.1002198
- 51. Davison F, Nair V. Use of Marek's disease vaccines: could they be driving the virus to increasing virulence? Expert Review of Vaccines. 2005;4(1):77-88. doi:10.1586/14760584.4.1.77
- 52. Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. Nature. 2001;414(6865):751-756. doi:10.1038/414751a
- 53. Sharma JM, Burmester BR. Resistance of Marek's Disease at Hatching in Chickens Vaccinated as Embryos with the Turkey Herpesvirus. Avian Diseases. 1982;26(1):134-149. doi:10.2307/1590032
- 54. Sharma JM, Witter RL. Embryo Vaccination against Marek's Disease with Serotypes 1, 2 and 3 Vaccines Administered Singly or in Combination. Avian Diseases. 1983;27(2):453-463. doi:10.2307/1590171
- 55. International Chicken Genome Sequencing C. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature. 2004;432(7018):695-716. doi:10.1038/nature03154
- 56. McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Rep. 2004;5(7):728-733. doi:10.1038/sj.embor.7400171
- 57. Naseri D, Dormiani K, Hajian M, Jafarpour F, Forouzanfar M, Karimi N, et al. Improving germline transmission efficiency in chimeric chickens using a multi-stage injection approach. PLoS One. 2021;16(6):e0247471. doi:10.1371/journal.pone.0247471
- 58. Challagulla A, Jenkins KA, O'Neil TE, Morris KR, Wise TG, Tizard ML, et al. Germline engineering of the chicken genome using CRISPR/Cas9 by in vivo transfection of PGCs. Anim Biotechnol. 2023;34(4):775-784. doi:10.1080/10495398.2020.1789869
- 59. Idoko-Akoh A, Goldhill DH, Sheppard CM, Bialy D, Quantrill JL, Sukhova K, et al. Creating resistance to avian influenza infection through genome editing of the ANP32 gene family. Nature Communications. 2023;14(1):6136. doi:10.1038/s41467-023-41476-3
- 60. Lee KY, Choi HJ, Park KJ, Woo SJ, Kim YM, Han JY. Development and characterization of a CRISPR/Cas9-mediated RAG1 knockout chicken model lacking mature B and T cells. Frontiers in Immunology. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.892476
- 61. von Heyl T, Klinger R, Aumann D, Zenner C, Alhussien M, Schlickenrieder A, et al. Loss of  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T cells in chickens causes a severe phenotype. Eur J Immunol. 2023;53(12):e2350503. doi:10.1002/eji.202350503
- 62. Mwangi WN, Beal RK, Powers C, Wu X, Humphrey T, Watson M, et al. Regional and global changes in TCRαβ T cell repertoires in the gut are dependent upon the complexity of the enteric microflora. Developmental & Comparative Immunology. 2010;34(4):406-417. doi:10.1016/j.dci.2009.11.009

63. Herausgegeben von, Kaspers B, Schat KA, Göbel TW, Vervelde L. Avian Immunology. 3 ed: Academic Press; 2022.

- 64. Martins YC, Ribeiro-Gomes FL, Daniel-Ribeiro CT. A short history of innate immunity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2023;118:e230023. doi:10.1590/0074-02760230023
- 65. Merien F. A Journey with Elie Metchnikoff: From Innate Cell Mechanisms in Infectious Diseases to Quantum Biology. Front Public Health. 2016;4:125. doi:10.3389/fpubh.2016.00125
- 66. Kaufmann SHE. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. Nature Immunology. 2008;9(7):705-712. doi:10.1038/ni0708-705
- 67. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. 9 ed: Springer Spektrum; 2018.
- 68. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):291. doi:10.1038/s41392-021-00687-0
- 69. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989;54 Pt 1:1-13. doi:10.1101/sqb.1989.054.01.003
- 70. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. Immunology. 2016;148(2):125-139. doi:10.1111/imm.12597
- 71. Bradley LM, Croft M, Swain SL. T-cell memory: new perspectives. Immunology Today. 1993;14(5):197-199. doi:10.1016/0167-5699(93)90161-D
- 72. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986;136(7):2348-2357.
- 73. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/ni1254
- 74. Corthay A. How do regulatory T cells work? Scand J Immunol. 2009;70(4):326-336. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x
- 75. Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. Cell. 1997;89(2):167-170. doi:10.1016/s0092-8674(00)80195-6
- 76. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature. 1974;248(5450):701-702. doi:10.1038/248701a0
- 77. Klein J. Seeds of time: fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. Immunogenetics. 1986;24(6):331-338. doi:10.1007/bf00377947
- 78. Burnet FM. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity: Vanderbilt University Press; 1959.
- 79. Crotty S, Ahmed R. Immunological memory in humans. Seminars in Immunology. 2004;16(3):197-203. doi:10.1016/j.smim.2004.02.008
- 80. Morrissey KA, Sampson JM, Rivera M, Bu L, Hansen VL, Gemmell NJ, et al. Comparison of Reptilian Genomes Reveals Deletions Associated with the Natural Loss of gammadelta T Cells in Squamates. J Immunol. 2022;208(8):1960-1967. doi:10.4049/jimmunol.2101158
- 81. Candéias S, Muegge K, Durum SK. Junctional diversity in signal joints from T cell receptor beta and delta loci via terminal deoxynucleotidyl transferase and exonucleolytic activity. J Exp Med. 1996;184(5):1919-1926. doi:10.1084/jem.184.5.1919
- 82. Liu F, Li J, Lin IYC, Yang X, Ma J, Chen Y, et al. The Genome Resequencing of TCR Loci in Gallus gallus Revealed Their Distinct Evolutionary Features in Avians. Immunohorizons. 2020;4(1):33-46. doi:10.4049/immunohorizons.1900095
- 83. Dunon D, Schwager J, Dangy JP, Cooper MD, Imhof BA. T cell migration during development: homing is not related to TCR V beta 1 repertoire selection. The EMBO Journal. 1994;13(4):808-815-815. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06323.x
- 84. Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. Annu Rev Biochem. 2002;71:101-132. doi:10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203
- 85. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. Annu Rev Immunol. 2000;18:495-527. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.495

- 86. Thompson CB. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. Immunity. 1995;3(5):531-539. doi:10.1016/1074-7613(95)90124-8
- 87. Yang B, Gathy KN, Coleman MS. T-cell specific avian TdT: characterization of the cDNA and recombinant enzyme. Nucleic Acids Research. 1995;23(11):2041-2048. doi:10.1093/nar/23.11.2041
- 88. Herrmann T, Karunakaran MM, Fichtner AS. A glance over the fence: Using phylogeny and species comparison for a better understanding of antigen recognition by human gammadelta T-cells. Immunol Rev. 2020;298(1):218-236. doi:10.1111/imr.12919
- 89. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, et al. LIGAND RECOGNITION BY  $\alpha\beta$  T CELL RECEPTORS. Annual Review of Immunology. 1998;16(1):523-544. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.523
- 90. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 1983;302(5909):575-581. doi:10.1038/302575a0
- 91. Kubota T. Characterization of an Avian (Gallus gallus domesticus) TCRad Gene Locus. The Journal of Immunology. 1999;163:3858-3866.
- 92. Clark SP, Arden B, Kabelitz D, Mak TW. Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies. Immunogenetics. 1995;42(6):531-540. doi:10.1007/BF00172178
- 93. Genevée C, Chung V, Diu A, Hercend T, Triebel F. TCR gene segments from at least one third of Va subfamilies rearrange at the  $\delta$  locus. Molecular Immunology. 1994;31(2):109-115. doi:10.1016/0161-5890(94)90083-3
- 94. Chiei Y-h, Iwashima M, Wettstein DA, Kaplan KB, Elliott JF, Born W, et al. T-cell receptor δ gene rearrangements in early thymocytes. Nature. 1987;330(6150):722-727. doi:10.1038/330722a0
- 95. Isobe M, Russo G, Haluska FG, Croce CM. Cloning of the gene encoding the delta subunit of the human T-cell receptor reveals its physical organization within the alpha-subunit locus and its involvement in chromosome translocations in T-cell malignancy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(11):3933-3937. doi:10.1073/pnas.85.11.3933
- 96. Hockett RD, de Villartay JP, Pollock K, Poplack DG, Cohen DI, Korsmeyer SJ. Human T-cell antigen receptor (TCR) delta-chain locus and elements responsible for its deletion are within the TCR alpha-chain locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(24):9694-9698. doi:10.1073/pnas.85.24.9694
- 97. Murre C, Waldmann RA, Morton CC, Bongiovanni KF, Waldmann TA, Shows TB, et al. Human γ-chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. Nature. 1985;316(6028):549-552. doi:10.1038/316549a0
- 98. Rabbitts TH, Lefranc MP, Stinson MA, Sims JE, Schroder J, Steinmetz M, et al. The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell leukaemia. Embo j. 1985;4(6):1461-1465. doi:10.1002/j.1460-2075.1985.tb03803.x
- 99. Caccia N, Kronenberg M, Saxe D, Haars R, Bruns GA, Goverman J, et al. The T cell receptor beta chain genes are located on chromosome 6 in mice and chromosome 7 in humans. Cell. 1984;37(3):1091-1099. doi:10.1016/0092-8674(84)90443-4
- 100. Croce CM, Isobe M, Palumbo A, Puck J, Ming J, Tweardy D, et al. Gene for alpha-chain of human T-cell receptor: location on chromosome 14 region involved in T-cell neoplasms. Science. 1985;227(4690):1044-1047. doi:10.1126/science.3919442
- 101. Jones C, Morse HG, Kao FT, Carbone A, Palmer E. Human T-cell receptor alpha-chain genes: location on chromosome 14. Science. 1985;228(4695):83-85. doi:10.1126/science.3919444
- 102. Collins MKL, Goodfellow PN, Spurr NK, Solomon E, Tanigawa G, Tonegawa S, et al. The human T-cell receptor  $\alpha$ -chain gene maps to chromosome 14. Nature. 1985;314(6008):273-274. doi:10.1038/314273a0
- 103. Caccia N, Bruns GA, Kirsch IR, Hollis GF, Bertness V, Mak TW. T cell receptor alpha chain genes are located on chromosome 14 at 14q11-14q12 in humans. J Exp Med. 1985;161(5):1255-1260. doi:10.1084/jem.161.5.1255
- 104. Six A, Rast JP, McCormack WT, Dunon D, Courtois D, Li Y, et al. Characterization of avian T-cell receptor gamma genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(26):15329-15334. doi:10.1073/pnas.93.26.15329

105. Zhang T, Liu G, Wei Z, Wang Y, Kang L, Jiang Y, et al. Genomic organization of the chicken TCR $\beta$  locus originated by duplication of a V $\beta$  segment combined with a trypsinogen gene. Vet Immunol Immunopathol. 2020;219:109974. doi:10.1016/j.vetimm.2019.109974

- 106. Parra ZE, Miller RD. Comparative analysis of the chicken TCRalpha/delta locus. Immunogenetics. 2012;64(8):641-645. doi:10.1007/s00251-012-0621-5
- 107. Parra ZE, Mitchell K, Dalloul RA, Miller RD. A second TCRdelta locus in Galliformes uses antibody-like V domains: insight into the evolution of TCRdelta and TCRmu genes in tetrapods. J Immunol. 2012;188(8):3912-3919. doi:10.4049/jimmunol.1103521
- 108. Yang Z, Sun Y, Ma Y, Li Z, Zhao Y, Ren L, et al. A comprehensive analysis of the germline and expressed TCR repertoire in White Peking duck. Sci Rep. 2017;7:41426. doi:10.1038/srep41426
- 109. Malissen B, Ardouin L, Lin SY, Gillet A, Malissen M. Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. Adv Immunol. 1999;72:103-148. doi:10.1016/s0065-2776(08)60018-8
- 110. Göbel TW, Bolliger L. Evolution of the T cell receptor signal transduction units. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;248:303-320. doi:10.1007/978-3-642-59674-2 14
- 111. Göbel TWF, Dangy J-P. Evidence for a Stepwise Evolution of the CD3 Family1. The Journal of Immunology. 2000;164(2):879-883. doi:10.4049/jimmunol.164.2.879
- 112. Hayes SM, Love PE. Stoichiometry of the murine  $\gamma\delta$  T cell receptor. Journal of Experimental Medicine. 2006;203(1):47-52. doi:10.1084/jem.20051886
- 113. Göbel TWF, Fluri M. Identification and analysis of the chicken CD3ε gene. European Journal of Immunology. 1997;27(1):194-198. doi:10.1002/eji.1830270129
- 114. Bernot A, Auffray C. Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88(6):2550-2554. doi:10.1073/pnas.88.6.2550
- 115. Chen CL, Ager LL, Gartland GL, Cooper MD. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. J Exp Med. 1986;164(1):375-380. doi:10.1084/jem.164.1.375
- 116. Araki K, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. Characterization and expression analysis of CD3 $\epsilon$  and CD3 $\epsilon$ / $\delta$  in fugu, Takifugu rubripes. Immunogenetics. 2005;57(1):158-163. doi:10.1007/s00251-005-0772-8
- 117. Alabyev BY, Guselnikov SV, Najakshin AM, Mechetina LV, Taranin AV. CD3ε homologues in the chondrostean fish Acipenser ruthenus. Immunogenetics. 2000;51(12):1012-1020. doi:10.1007/s002510000236
- 118. Dzialo RC, Cooper MD. An amphibian CD3 homologue of the mammalian CD3  $\gamma$  and  $\delta$  genes. European Journal of Immunology. 1997;27(7):1640-1647. doi:10.1002/eji.1830270708
- 119. Berry R, Headey SJ, Call MJ, McCluskey J, Tregaskes CA, Kaufman J, et al. Structure of the Chicken CD3 $\epsilon\delta/\gamma$  Heterodimer and Its Assembly with the  $\alpha\beta T$  Cell Receptor\*. Journal of Biological Chemistry. 2014;289(12):8240-8251. doi:10.1074/jbc.M113.544965
- 120. Göbel TWF, Bolliger L. Cutting Edge: The Chicken TCR ζ-Chain Restores the Function of a Mouse T Cell Hybridoma1. The Journal of Immunology. 1998;160(4):1552-1554. doi:10.4049/jimmunol.160.4.1552
- 121. Bucy RP, Chen CH, Cooper MD. Analysis of gamma delta T cells in the chicken. Semin Immunol. 1991;3(2):109-117.
- 122. Littman DR. The structure of the CD4 and CD8 genes. Annu Rev Immunol. 1987;5:561-584. doi:10.1146/annurev.iy.05.040187.003021
- 123. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. Nat Rev Immunol. 2010;10(7):467-478. doi:10.1038/nri2781
- 124. Bucy RP, Chen CL, Cooper MD. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. The Journal of Immunology. 1989;142(9):3045-3049. doi:10.4049/jimmunol.142.9.3045
- 125. Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E, Chen CL, Ratcliffe MJ, Davison TF, et al. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. The Journal of Immunology. 1995;154(9):4485-4494. doi:10.4049/jimmunol.154.9.4485

126. Luhtala M, Lassila O, Toivanen P, Vainio O. A novel peripheral CD4+CD8+ T cell population: Inheritance of CD8 $\alpha$  expression on CD4+ T cells. European Journal of Immunology. 1997;27(1):189-193. doi:10.1002/eji.1830270128

- 127. Kasahara Y, Chen CH, Cooper MD. Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming. Eur J Immunol. 1993;23(9):2230-2236. doi:10.1002/eji.1830230927
- 128. Chen CL, Cihak J, Lösch U, Cooper MD. Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. Eur J Immunol. 1988;18(4):539-543. doi:10.1002/eji.1830180408
- 129. Veillette A, Ratcliffe MJ. Avian CD4 and CD8 interact with a cellular tyrosine protein kinase homologous to mammalian p56lck. Eur J Immunol. 1991;21(2):397-401. doi:10.1002/eji.1830210222
- 130. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. Cell. 1988;55(2):301-308. doi:10.1016/0092-8674(88)90053-0
- 131. Ngoenkam J, Schamel WW, Pongcharoen S. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor-CD3 complex. Immunology. 2018;153(1):42-50. doi:10.1111/imm.12809
- 132. Merkle H, Cihak J, Lösch U. The cytotoxic T lymphocyte response in reticuloendotheliosis virus-infected chickens is mediated by  $\alpha\beta$  and not by  $\gamma\delta$  T cells. Immunobiology. 1992;186(3):292-303. doi:10.1016/S0171-2985(11)80258-5
- 133. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SHE. Different roles of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. Nature. 1993;365(6441):53-56. doi:10.1038/365053a0
- 134. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2023;8(1):235. doi:10.1038/s41392-023-01471-y
- 135. Havran WL, Allison JP. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. Nature. 1988;335(6189):443-445. doi:10.1038/335443a0
- 136. Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, et al. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. Nature. 1987;326(6108):79-81. doi:10.1038/326079a0
- 137. Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. Determining  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cell development. Nature Reviews Immunology. 2010;10(9):657-663. doi:10.1038/nri2820
- 138. Chien Y-h, Meyer C, Bonneville M. γδ T Cells: First Line of Defense and Beyond. Annual Review of Immunology. 2014;32(1):121-155. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120216
- 139. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. Nature. 1986;322(6082):836-840. doi:10.1038/322836a0
- 140. Carding SR, Egan PJ.  $\gamma\delta$  T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nature Reviews Immunology. 2002;2(5):336-345. doi:10.1038/nri797
- 141. Fiala GJ, Gomes AQ, Silva-Santos B. From thymus to periphery: Molecular basis of effector  $\gamma\delta$ -T cell differentiation. Immunol Rev. 2020;298(1):47-60. doi:10.1111/imr.12918
- 142. Vermijlen D, Prinz I. Ontogeny of Innate T Lymphocytes Some Innate Lymphocytes are More Innate than Others. Front Immunol. 2014;5:486. doi:10.3389/fimmu.2014.00486
- 143. Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of gammadelta T cells. Eur J Immunol. 2013;43(8):1988-1994. doi:10.1002/eji.201343759
- 144. Sanchez Sanchez G, Tafesse Y, Papadopoulou M, Vermijlen D. Surfing on the waves of the human γδ T cell ontogenic sea. Immunol Rev. 2023;315(1):89-107. doi:10.1111/imr.13184
- 145. Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, von Boehmer H. Crucial role of the pre-T-cell receptor  $\alpha$  gene in development of ap but not  $\gamma\delta$  T cells. Nature. 1995;375(6534):795-798. doi:10.1038/375795a0
- 146. Parker ME, Ciofani M. Regulation of gammadelta T Cell Effector Diversification in the Thymus. Front Immunol. 2020;11:42. doi:10.3389/fimmu.2020.00042
- 147. Narayan K, Sylvia KE, Malhotra N, Yin CC, Martens G, Vallerskog T, et al. Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct  $\gamma\delta$  T cell subtypes. Nat Immunol. 2012;13(5):511-518. doi:10.1038/ni.2247

148. Muñoz-Ruiz M, Sumaria N, Pennington DJ, Silva-Santos B. Thymic Determinants of γδ T Cell Differentiation. Trends Immunol. 2017;38(5):336-344. doi:10.1016/j.it.2017.01.007

- 149. Chien YH, Zeng X, Prinz I. The natural and the inducible: interleukin (IL)-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. Trends Immunol. 2013;34(4):151-154. doi:10.1016/j.it.2012.11.004
- 150. Barbee SD, Woodward MJ, Turchinovich G, Mention JJ, Lewis JM, Boyden LM, et al. Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(8):3330-3335. doi:10.1073/pnas.1010890108
- 151. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhad M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP. Limited diversity of  $\gamma\delta$  antigen receptor genes of thy-1+ dendritic epidermal cells. Cell. 1988;55(5):837-847. doi:10.1016/0092-8674(88)90139-0
- 152. Havran WL, Chien Y-H, Allison JP. Recognition of Self Antigens by Skin-Derived T Cells with Invariant γδ Antigen Receptors. Science. 1991;252(5011):1430-1432.
- 153. Havran WL, Allison JP. Origin of Thy-1+ dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors. Nature. 1990;344(6261):68-70. doi:10.1038/344068a0
- 154. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, et al. Homing of a γδ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. Nature. 1990;343(6260):754-757. doi:10.1038/343754a0
- 155. Haas JD, González FHM, Schmitz S, Chennupati V, Föhse L, Kremmer E, et al. CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-γ-producing γδ effector T cells. European Journal of Immunology. 2009;39(12):3488-3497. doi:10.1002/eji.200939922
- 156. Gray EE, Suzuki K, Cyster JG. Cutting edge: Identification of a motile IL-17-producing gammadelta T cell population in the dermis. J Immunol. 2011;186(11):6091-6095. doi:10.4049/jimmunol.1100427
- 157. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. Immunity. 2009;31(2):321-330. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.020
- 158. Vicari AP, Mocci S, Openshaw P, O'Garra A, Zlotnik A. Mouse  $\gamma\delta$  TCR+NK1.1+ thymocytes specifically produce interleukin-4, are major histocompatibility complex class I independent, and are developmentally related to  $\alpha\beta$  TCR+NK1.1+ thymocytes. European Journal of Immunology. 1996;26(7):1424-1429. doi:10.1002/eji.1830260704
- 159. Azuara V, Levraud J-P, Lembezat M-P, Pereira P. A novel subset of adult γδ thymocytes that secretes a distinct pattern of cytokines and expresses a very restricted T cell receptor repertoire. European Journal of Immunology. 1997;27(2):544-553. doi:10.1002/eji.1830270228
- 160. Hayday A, Gibbons D. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. Mucosal Immunol. 2008;1(3):172-174. doi:10.1038/mi.2008.8
- 161. Gibbons DL, Haque SFY, Silberzahn T, Hamilton K, Langford C, Ellis P, et al. Neonates harbour highly active  $\gamma\delta$  T cells with selective impairments in preterm infants. European Journal of Immunology. 2009;39(7):1794-1806. doi:10.1002/eji.200939222
- 162. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. J Immunol. 1996;157(7):2873-2882.
- 163. Krangel MS, Yssel H, Brocklehurst C, Spits H. A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. J Exp Med. 1990;172(3):847-859. doi:10.1084/jem.172.3.847
- 164. McVay LD, Carding SR, Bottomly K, Hayday AC. Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny. Embo j. 1991;10(1):83-91. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb07923.x
- 165. Park JE, Jardine L, Gottgens B, Teichmann SA, Haniffa M. Prenatal development of human immunity. Science. 2020;368(6491):600-603. doi:10.1126/science.aaz9330
- 166. Papadopoulou M, Tieppo P, McGovern N, Gosselin F, Chan JKY, Goetgeluk G, et al. TCR Sequencing Reveals the Distinct Development of Fetal and Adult Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells. The Journal of Immunology. 2019;203(6):1468-1479. doi:10.4049/jimmunol.1900592

167. Šinkora M, Šinkora J, Reháková Z, Butler JE. Early Ontogeny of Thymocytes in Pigs: Sequential Colonization of the Thymus by T Cell Progenitors1. The Journal of Immunology. 2000;165(4):1832-1839. doi:10.4049/jimmunol.165.4.1832

- 168. Holtmeier W, Geisel W, Bernert K, Butler JE, Sinkora M, Reháková Z, et al. Prenatal development of the porcine TCR delta repertoire: dominant expression of an invariant T cell receptor Vdelta3-Jdelta3 chain. Eur J Immunol. 2004;34(7):1941-1949. doi:10.1002/eji.200425055
- 169. Hein WR, Dudler L. Divergent evolution of T cell repertoires: extensive diversity and developmentally regulated expression of the sheep gamma delta T cell receptor. Embo j. 1993;12(2):715-724. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05705.x
- 170. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. Nature. 1984;309(5971):757-762. doi:10.1038/309757a0
- 171. Piriou-Guzylack L, Salmon H. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. Vet Res. 2008;39(6):54. doi:10.1051/vetres:2008030
- 172. Mackay CR, Hein WR. A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. Int Immunol. 1989;1(5):540-545. doi:10.1093/intimm/1.5.540
- 173. McClure SJ, Hein WR, Yamaguchi K, Dudler L, Beya MF, Miyasaka M. Ontogeny, morphology and tissue distribution of a unique subset of CD4-CD8- sheep T lymphocytes. Immunol Cell Biol. 1989;67 ( Pt 4):215-221. doi:10.1038/icb.1989.33
- 174. Caro MR, Gallego MC, Buendía AJ, Navarro E, Navarro JA. Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. Research in Veterinary Science. 1998;65(2):145-148. doi:10.1016/S0034-5288(98)90166-7
- 175. Sawasdikosol S, Hague BF, Zhao TM, Bowers FS, Simpson RM, Robinson M, et al. Selection of rabbit CD4- CD8- T cell receptor-gamma/delta cells by in vitro transformation with human T lymphotropic virus-I. J Exp Med. 1993;178(4):1337-1345. doi:10.1084/jem.178.4.1337
- 176. Faldyna M, Levá L, Knötigová P, Toman M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. Vet Immunol Immunopathol. 2001;82(1-2):23-37. doi:10.1016/s0165-2427(01)00337-3
- 177. Takamatsu HH, Denyer MS, Stirling C, Cox S, Aggarwal N, Dash P, et al. Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. Vet Immunol Immunopathol. 2006;112(1-2):49-61. doi:10.1016/j.vetimm.2006.03.011
- 178. Hirt W, Saalmüller A, Reddehase MJ. Distinct gamma/delta T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8- T lymphocytes. Eur J Immunol. 1990;20(2):265-269. doi:10.1002/eji.1830200206
- 179. Yirsaw A, Baldwin CL. Goat  $\gamma\delta$  T cells. Dev Comp Immunol. 2021;114:103809. doi:10.1016/j.dci.2020.103809
- 180. Hein WR, Mackay CR. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. Immunol Today. 1991;12(1):30-34. doi:10.1016/0167-5699(91)90109-7
- 181. Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL. γδ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. Nat Rev Immunol. 2017;17(12):733-745. doi:10.1038/nri.2017.101
- 182. Caccamo N, Dieli F, Wesch D, Jomaa H, Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human  $V\gamma9/V\delta2$  T cells. Journal of Leukocyte Biology. 2006;79(4):663-666. doi:10.1189/jlb.1105640
- 183. Reitermaier R, Krausgruber T, Fortelny N, Ayub T, Vieyra-Garcia PA, Kienzl P, et al.  $\alpha\beta\gamma\delta$  T cells play a vital role in fetal human skin development and immunity. J Exp Med. 2021;218(4). doi:10.1084/jem.20201189
- 184. Sedlak C, Patzl M, Saalmuller A, Gerner W. CD2 and CD8alpha define porcine gammadelta T cells with distinct cytokine production profiles. Dev Comp Immunol. 2014;45(1):97-106. doi:10.1016/j.dci.2014.02.008
- 185. Ribeiro ST, Ribot JC, Silva-Santos B. Five Layers of Receptor Signaling in gammadelta T-Cell Differentiation and Activation. Front Immunol. 2015;6:15. doi:10.3389/fimmu.2015.00015

186. Bedoui S, Gebhardt T, Gasteiger G, Kastenmuller W. Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. Nat Immunol. 2016;17(5):490-494. doi:10.1038/ni.3432

- 187. Born WK, Jin N, Aydintug MK, Wands JM, French JD, Roark CL, et al. gammadelta T lymphocytes-selectable cells within the innate system? J Clin Immunol. 2007;27(2):133-144. doi:10.1007/s10875-007-9077-z
- 188. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. Nat Rev Immunol. 2013;13(2):88-100. doi:10.1038/nri3384
- 189. Ueta C, Kawasumi H, Fujiwara H, Miyagawa T, Kida H, Ohmoto Y, et al. Interleukin-12 activates human gamma delta T cells: synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha. Eur J Immunol. 1996;26(12):3066-3073. doi:10.1002/eji.1830261237
- 190. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Pillars Article: Regulation of Cutaneous Malignancy by γδ T Cells. Science. 2001. 294: 605-609. J Immunol. 2018;200(9):3031-3035.
- 191. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(13):6147-6151. doi:10.1073/pnas.92.13.6147
- 192. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity. 2009;31(2):184-196. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.006
- 193. Constant P, Davodeau F, Peyrat M-A, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of Human  $\gamma\delta$  T Cells by Nonpeptidic Mycobacterial Ligands. Science. 1994;264(5156):267-270. doi:doi:10.1126/science.8146660
- 194. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells. Nature. 1995;375(6527):155-158. doi:10.1038/375155a0
- 195. Born WK, Yin Z, Hahn YS, Sun D, O'Brien RL. Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. J Immunol. 2010;184(8):4055-4061. doi:10.4049/jimmunol.0903679
- 196. Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA.  $\gamma\delta$  T Cells Respond Directly to Pathogen-Associated Molecular Patterns 12. The Journal of Immunology. 2005;174(10):6045-6053. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6045
- 197. Yang R, Yao L, Shen L, Sha W, Modlin RL, Shen H, et al. IL-12 Expands and Differentiates Human Vgamma2Vdelta2 T Effector Cells Producing Antimicrobial Cytokines and Inhibiting Intracellular Mycobacterial Growth. Front Immunol. 2019;10:913. doi:10.3389/fimmu.2019.00913
- 198. Aste-Amezaga M, D'Andrea A, Kubin M, Trinchieri G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. Cell Immunol. 1994;156(2):480-492. doi:10.1006/cimm.1994.1192
- 199. Ramstead AG, Jutila MA. Complex role of  $\gamma\delta$  T-cell-derived cytokines and growth factors in cancer. J Interferon Cytokine Res. 2012;32(12):563-569. doi:10.1089/jir.2012.0073
- 200. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. Nat Rev Immunol. 2009;9(8):568-580. doi:10.1038/nri2604
- 201. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan PL, et al. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. J Infect Dis. 2009;200(6):858-865. doi:10.1086/605413
- 202. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, et al. Granulysin-Dependent Killing of Intracellular and Extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vγ9/Vδ2 T Lymphocytes. The Journal of Infectious Diseases. 2001;184(8):1082-1085. doi:10.1086/323600
- 203. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. J Immunol. 2008;181(5):3456-3463. doi:10.4049/jimmunol.181.5.3456
- 204. Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, Yamasaki S, et al. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. Immunity. 2008;29(1):90-100. doi:10.1016/j.immuni.2008.04.022

205. Kohlgruber AC, Gal-Oz ST, LaMarche NM, Shimazaki M, Duquette D, Koay HF, et al.  $\gamma\delta$  T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. Nat Immunol. 2018;19(5):464-474. doi:10.1038/s41590-018-0094-2

- 206. Ono T, Okamoto K, Nakashima T, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, et al. IL-17-producing γδ T cells enhance bone regeneration. Nature Communications. 2016;7(1):10928. doi:10.1038/ncomms10928
- 207. Phillips JH, Weiss A, Gemlo BT, Rayner AA, Lanier LL. Evidence that the T cell antigen receptor may not be involved in cytotoxicity mediated by gamma/delta and alpha/beta thymic cell lines. J Exp Med. 1987;166(5):1579-1584. doi:10.1084/jem.166.5.1579
- 208. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. Science. 2005;309(5732):264-268. doi:10.1126/science.1110267
- 209. O'Brien RL, Born WK. gammadelta T cell subsets: a link between TCR and function? Semin Immunol. 2010;22(4):193-198. doi:10.1016/j.smim.2010.03.006
- 210. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. Nature. 2003;422(6928):164-169. doi:10.1038/nature01433
- 211. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AM, Born WK, O'Brien RL, et al. IL-17A-expressing T cells are essential for bacterial clearance in a murine model of hypersensitivity pneumonitis. J Immunol. 2009;182(10):6540-6549. doi:10.4049/jimmunol.0900013
- 212. Gerber DJ, Azuara V, Levraud JP, Huang SY, Lembezat MP, Pereira P. IL-4-producing gamma delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. J Immunol. 1999;163(6):3076-3082.
- 213. Smith AL, Hayday AC. An alphabeta T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by gammadelta cells. Immunology. 2000;101(3):325-332. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00122.x
- 214. Behr C, Dubois P. Preferential expansion of V $\gamma$ 9 V $\delta$ 2 T cells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of Plasmodium falciparum. International Immunology. 1992;4(3):361-366. doi:10.1093/intimm/4.3.361
- 215. Pechhold K, Wesch D, Schondelmaier S, Kabelitz D. Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. J Immunol. 1994;152(10):4984-4992.
- 216. Uyemura K, Deans RJ, Band H, Ohmen J, Panchamoorthy G, Morita CT, et al. Evidence for clonal selection of gamma/delta T cells in response to a human pathogen. J Exp Med. 1991;174(3):683-692. doi:10.1084/jem.174.3.683
- 217. Nishimura H, Yajima T, Kagimoto Y, Ohata M, Watase T, Kishihara K, et al. Intraepithelial gammadelta T cells may bridge a gap between innate immunity and acquired immunity to herpes simplex virus type 2. J Virol. 2004;78(9):4927-4930. doi:10.1128/jvi.78.9.4927-4930.2004
- 218. Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL, Bluestone JA. T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. J Exp Med. 1997;185(11):1969-1975. doi:10.1084/jem.185.11.1969
- 219. Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, Hamano S, Yoshida H, Yoshikai Y, et al. Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. Immunology. 2000;99(2):187-194. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00938.x
- 220. Sing G, Butterworth L, Chen X, Bryant A, Cooksley G. Composition of peripheral blood lymphocyte populations during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. Journal of Viral Hepatitis. 1998;5(2):83-93. doi:10.1046/j.1365-2893.1998.00088.x
- 221. Qureshi MH, Zhang T, Koguchi Y, Nakashima K, Okamura H, Kurimoto M, et al. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection withCryptococcus neoformans. European Journal of Immunology. 1999;29(2):643-649. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199902)29:02<643::Aid-immu643>3.0.Co;2-e

222. Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. J Exp Med. 1990;172(4):1225-1231. doi:10.1084/jem.172.4.1225

- 223. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by γδ T cells in vivo. Nature. 1995;373(6511):255-257. doi:10.1038/373255a0
- 224. Amadori M, Archetti IL, Verardi R, Berneri C. Role of a distinct population of bovine gamma delta T cells in the immune response to viral agents. Viral Immunol. 1995;8(2):81-91. doi:10.1089/vim.1995.8.81
- 225. Xu W, Monaco G, Wong EH, Tan WLW, Kared H, Simoni Y, et al. Mapping of  $\gamma/\delta$  T cells reveals V $\delta$ 2+ T cells resistance to senescence. EBioMedicine. 2019;39:44-58. doi:10.1016/j.ebiom.2018.11.053
- 226. Ramsburg E, Tigelaar R, Craft J, Hayday A. Age-dependent requirement for gammadelta T cells in the primary but not secondary protective immune response against an intestinal parasite. J Exp Med. 2003;198(9):1403-1414. doi:10.1084/jem.20030050
- 227. Chen YS, Chen IB, Pham G, Shao TY, Bangar H, Way SS, et al. IL-17-producing γδ T cells protect against Clostridium difficile infection. J Clin Invest. 2020;130(5):2377-2390. doi:10.1172/jci127242
- 228. Ma L, Papadopoulou M, Taton M, Genco F, Marchant A, Meroni V, et al. Effector Vγ9Vδ2 T cell response to congenital Toxoplasma gondii infection. JCI Insight. 2021;6(16). doi:10.1172/jci.insight.138066
- 229. Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, Liesnard C, Tackoen M, Van Rysselberge M, et al. Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J Exp Med. 2010;207(4):807-821. doi:10.1084/jem.20090348
- 230. Sanchez Sanchez G, Papadopoulou M, Azouz A, Tafesse Y, Mishra A, Chan JKY, et al. Identification of distinct functional thymic programming of fetal and pediatric human  $\gamma\delta$  thymocytes via single-cell analysis. Nat Commun. 2022;13(1):5842. doi:10.1038/s41467-022-33488-2
- 231. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature. 2000;406(6793):309-314. doi:10.1038/35018581
- 232. Sebestyen Z, Prinz I, Déchanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta ( $\gamma\delta$ ) T cells and their receptors into cancer cell therapies. Nat Rev Drug Discov. 2020;19(3):169-184. doi:10.1038/s41573-019-0038-z
- 233. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. γδ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. Nat Rev Cancer. 2019;19(7):392-404. doi:10.1038/s41568-019-0153-5
- 234. Domae E, Hirai Y, Ikeo T, Goda S, Shimizu Y. Cytokine-mediated activation of human ex vivo-expanded Vgamma9Vdelta2 T cells. Oncotarget. 2017;8(28):45928-45942. doi:10.18632/oncotarget.17498
- 235. Rajasekar R, Augustin A. Selective proliferation of gamma delta T lymphocytes exposed to high doses of ionomycin. J Immunol. 1992;149(3):818-824.
- 236. Lynch F, Shevach EM. Activation requirements of newborn thymic gamma delta T cells. J Immunol. 1992;149(7):2307-2314.
- 237. Sedlak C, Patzl M, Saalmuller A, Gerner W. IL-12 and IL-18 induce interferon-gamma production and de novo CD2 expression in porcine gammadelta T cells. Dev Comp Immunol. 2014;47(1):115-122. doi:10.1016/j.dci.2014.07.007
- 238. Gollob JA, Schnipper CP, Murphy EA, Ritz J, Frank DA. The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation. Journal of Immunology. 1999;162(8):4472-4481.
- 239. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J Exp Med. 1989;170(3):827-845. doi:10.1084/jem.170.3.827
- 240. Wang KS, Frank DA, Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. Blood. 2000;95(10):3183-3190. doi:DOI 10.1182/blood.V95.10.3183.010k36\_3183\_3190

241. Mehrotra PT, Wu D, Crim JA, Mostowski HS, Siegel JP. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. J Immunol. 1993;151(5):2444-2452.

- 242. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). J Immunol. 1991;147(3):874-882.
- 243. van der Heyde HC, Manning DD, Weidanz WP. Role of CD4+ T cells in the expansion of the CD4-, CD8- gamma delta T cell subset in the spleens of mice during blood-stage malaria. J Immunol. 1993;151(11):6311-6317.
- 244. MacDonald HR, Schreyer M, Howe RC, Bron C. Selective expression of CD8 alpha (Ly-2) subunit on activated thymic gamma/delta cells. Eur J Immunol. 1990;20(4):927-930. doi:10.1002/eji.1830200431
- 245. Cron RQ, Gajewski TF, Sharrow SO, Fitch FW, Matis LA, Bluestone JA. Phenotypic and functional analysis of murine CD3+,CD4-,CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. J Immunol. 1989;142(11):3754-3762.
- 246. Kalia V, Sarkar S. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act. Front Immunol. 2018;9:2987. doi:10.3389/fimmu.2018.02987
- 247. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nature Reviews Immunology. 2012;12(3):180-190. doi:10.1038/nri3156
- 248. Liu J, Cao S, Kim S, Chung EY, Homma Y, Guan X, et al. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. Curr Immunol Rev. 2005;1(2):119-137. doi:10.2174/1573395054065115
- 249. Price SJ, Sopp P, Howard CJ, Hope JC. Workshop cluster 1+ gammadelta T-cell receptor T cells from calves express high levels of interferon-gamma in response to stimulation with interleukin-12 and -18. Immunology. 2007;120(1):57-65. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02477.x
- 250. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. J Exp Med. 1991;173(4):869-879. doi:10.1084/jem.173.4.869
- 251. Schilbach K, Welker C, Krickeberg N, Kaisser C, Schleicher S, Hashimoto H. In the Absence of a TCR Signal IL-2/IL-12/18-Stimulated gammadelta T Cells Demonstrate Potent Anti-Tumoral Function Through Direct Killing and Senescence Induction in Cancer Cells. Cancers (Basel). 2020;12(1). doi:10.3390/cancers12010130
- 252. Dunon D, Cooper MD, Imhof BA. Thymic origin of embryonic intestinal gamma/delta T cells. J Exp Med. 1993;177(2):257-263. doi:10.1084/jem.177.2.257
- 253. Dunon D, Courtois D, Vainio O, Six A, Chen CH, Cooper MD, et al. Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. J Exp Med. 1997;186(7):977-988. doi:10.1084/jem.186.7.977
- 254. Coltey M, Bucy RP, Chen CH, Cihak J, Lösch U, Char D, et al. Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras. J Exp Med. 1989;170(2):543-557. doi:10.1084/jem.170.2.543
- 255. Coltey M, Jotereau FV, Le Douarin NM. Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus. Cell Differ. 1987;22(1):71-82. doi:10.1016/0045-6039(87)90414-3
- 256. Dunon D, Kaufman J, Salomonsen J, Skjoedt K, Vainio O, Thiery JP, et al. T cell precursor migration towards beta 2-microglobulin is involved in thymus colonization of chicken embryos. Embo j. 1990;9(10):3315-3322. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07531.x
- 257. Dunon D, Allioli N, Vainio O, Ody C, Imhof BA. Quantification of T-cell progenitors during ontogeny: thymus colonization depends on blood delivery of progenitors. Blood. 1999;93(7):2234-2243.
- 258. Penit C, Jotereau F, Gelabert MJ. Relationships between terminal transferase expression, stem cell colonization, and thymic maturation in the avian embryo: studies in thymic chimeras resulting from homospecific and heterospecific grafts. J Immunol. 1985;134(4):2149-2154.
- 259. Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. Blood. 1979;54(6):1203-1215.
- 260. Bucy RP, Chen CH, Cooper MD. Ontogeny of T cell receptors in the chicken thymus. J Immunol. 1990;144(4):1161-1168.

261. Char D, Sanchez P, Chen CL, Bucy RP, Cooper MD. A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody. J Immunol. 1990;145(11):3547-3555.

- 262. Davidson NJ, Boyd RL. Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel thymocyte subsets. Int Immunol. 1992;4(10):1175-1182. doi:10.1093/intimm/4.10.1175
- 263. Cooper MD, Bucy RP, George JF, Lahti JM, Char D, Chen CL. T-cell development in birds. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989;54 Pt 1:69-73. doi:10.1101/sqb.1989.054.01.009
- 264. Chen CH, Sowder JT, Lahti JM, Cihak J, Losch U, Cooper MD. TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(7):2351-2355. doi:10.1073/pnas.86.7.2351
- 265. Tjoelker LW, Carlson LM, Lee K, Lahti J, McCormack WT, Leiden JM, et al. Evolutionary conservation of antigen recognition: the chicken T-cell receptor beta chain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(20):7856-7860. doi:10.1073/pnas.87.20.7856
- 266. Lahti JM, Chen CL, Tjoelker LW, Pickel JM, Schat KA, Calnek BW, et al. Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88(23):10956-10960. doi:10.1073/pnas.88.23.10956
- 267. Cihak J, Ziegler-Heitbrock HW, Trainer H, Schranner I, Merkenschlager M, Lösch U. Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. Eur J Immunol. 1988;18(4):533-537. doi:10.1002/eji.1830180407
- 268. Bucy RP, Chen CL, Cihak J, Lösch U, Cooper MD. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. J Immunol. 1988;141(7):2200-2205.
- 269. Arstila TP, Lassila O. Androgen-induced expression of the peripheral blood gamma delta T cell population in the chicken. J Immunol. 1993;151(12):6627-6633.
- 270. Johnston CE, Hartley C, Salisbury AM, Wigley P. Immunological changes at point-of-lay increase susceptibility to Salmonella enterica Serovar enteritidis infection in vaccinated chickens. PLoS One. 2012;7(10):e48195. doi:10.1371/journal.pone.0048195
- 271. Zhao Y, Kurian D, Xu H, Petherbridge L, Smith LP, Hunt L, et al. Interaction of Marek's disease virus oncoprotein Meq with heat-shock protein 70 in lymphoid tumour cells. J Gen Virol. 2009;90(Pt 9):2201-2208. doi:10.1099/vir.0.012062-0
- 272. Iqbal M, Philbin Victoria J, Withanage GSK, Wigley P, Beal Richard K, Goodchild Marianne J, et al. Identification and Functional Characterization of Chicken Toll-Like Receptor 5 Reveals a Fundamental Role in the Biology of Infection with Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Infection and Immunity. 2005;73(4):2344-2350. doi:10.1128/iai.73.4.2344-2350.2005
- 273. Matsuyama-Kato A, Iseki H, Boodhoo N, Bavananthasivam J, Alqazlan N, Abdul-Careem MF, et al. Phenotypic characterization of gamma delta (gammadelta) T cells in chickens infected with or vaccinated against Marek's disease virus. Virology. 2022;568:115-125. doi:10.1016/j.virol.2022.01.012
- 274. Laursen AMS, Kulkarni RR, Taha-Abdelaziz K, Plattner BL, Read LR, Sharif S. Characterizaton of gamma delta T cells in Marek's disease virus (Gallid herpesvirus 2) infection of chickens. Virology. 2018;522:56-64. doi:10.1016/j.virol.2018.06.014
- 275. Berndt A, Pieper J, Methner U. Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. Infect Immun. 2006;74(7):3967-3978. doi:10.1128/iai.01128-05
- 276. Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated Salmonella typhimurium strains. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2001;78(2):143-161. doi:10.1016/S0165-2427(00)00264-6
- 277. Lillehoj HS. Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. Res Vet Sci. 1994;56(1):1-7. doi:10.1016/0034-5288(94)90188-0
- 278. Bessay M, Le Vern Y, Kerboeuf D, Yvoré P, Quéré P. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an Eimeria infection in chickens: comparative study between E acervulina and E tenella. Vet Res. 1996;27(4-5):503-514.

279. Chen CH, Gobel TW, Kubota T, Cooper MD. T cell development in the chicken. Poult Sci. 1994;73(7):1012-1018. doi:10.3382/ps.0731012

- 280. Quere P, Bhogal BS, Thorbecke GJ. Characterization of suppressor T cells for antibody production by chicken spleen cells. II. Comparison of CT8+ cells from concanavalin A-injected normal and bursa cell-injected agammaglobulinaemic chickens. Immunology. 1990;71(4):523-529.
- 281. Fenzl L, Göbel TW, Neulen ML. γδ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken. Dev Comp Immunol. 2017;73:175-183. doi:10.1016/j.dci.2017.03.028
- 282. Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on  $\gamma\delta$  T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and  $\gamma\delta$  T-cells. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2000;73(3):309-321. doi:10.1016/S0165-2427(00)00148-3
- 283. Matsuyama-Kato A, Shojadoost B, Boodhoo N, Raj S, Alizadeh M, Fazel F, et al. Activated Chicken Gamma Delta T Cells Are Involved in Protective Immunity against Marek's Disease. Viruses. 2023;15(2). doi:10.3390/v15020285
- 284. Pieper J, Methner U, Berndt A. Characterization of avian gammadelta T-cell subsets after Salmonella enterica serovar Typhimurium infection of chicks. Infect Immun. 2011;79(2):822-829. doi:10.1128/IAI.00788-10
- 285. Parvizi P, Brisbin JT, Read LR, Sharif S. Cytokine Gene Expression in Lung Mononuclear Cells of Chickens Vaccinated with Herpesvirus of Turkeys and Infected with Marek's Disease Virus. Viral Immunol. 2015;28(9):538-543. doi:10.1089/vim.2015.0054
- 286. Abdul-Careem MF, Hunter BD, Lee LF, Fairbrother JH, Haghighi HR, Read L, et al. Host responses in the bursa of Fabricius of chickens infected with virulent Marek's disease virus. Virology. 2008;379(2):256-265. doi:10.1016/j.virol.2008.06.027
- 287. Pieper J, Methner U, Berndt A. Heterogeneity of avian gammadelta T cells. Vet Immunol Immunopathol. 2008;124(3-4):241-252. doi:10.1016/j.vetimm.2008.03.008
- 288. Parvizi P, Read LR, Abdul-Careem MF, Sarson AJ, Lusty C, Lambourne M, et al. Cytokine gene expression in splenic CD4+ and CD8+ T cell subsets of genetically resistant and susceptible chickens infected with Marek's disease virus. Vet Immunol Immunopathol. 2009;132(2-4):209-217. doi:10.1016/j.vetimm.2009.06.009
- 289. Tsuji S, Char D, Bucy RP, Simonsen M, Chen C-LH, Cooper MD.  $\gamma\delta$  T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4+  $\alpha\beta$ T cells. European Journal of Immunology. 1996;26(2):420-427. doi:10.1002/eji.1830260223
- 290. Kaiser P, Mariani P. Promoter sequence, exon:intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T-cell proliferative activity is IL2 and not IL15. Immunogenetics. 1999;49(1):26-35. doi:10.1007/s002510050460
- 291. Balu S, Kaiser P. Avian Interleukin-12 $\beta$  (p40): Cloning and Characterization of the cDNA and Gene. Journal of Interferon & Cytokine Research. 2003;23(12):699-707. doi:10.1089/107999003772084815
- 292. Göbel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, Weigend S, et al. IL-18 Stimulates the Proliferation and IFN-γ Release of CD4+ T Cells in the Chicken: Conservation of a Th1-Like System in a Nonmammalian Species1. The Journal of Immunology. 2003;171(4):1809-1815. doi:10.4049/jimmunol.171.4.1809
- 293. Huhle D, Hirmer S, Gobel TW. Splenic gammadelta T cell subsets can be separated by a novel mab specific for two CD45 isoforms. Dev Comp Immunol. 2017;77:229-240. doi:10.1016/j.dci.2017.08.013
- 294. Scherer S, Gobel TW. Characterisation of chicken OX40 and OX40L. Dev Comp Immunol. 2018;82:128-138. doi:10.1016/j.dci.2018.01.014
- 295. Polasky C, Weigend S, Schrader L, Berndt A. Non-specific activation of CD8 $\alpha$ -characterised  $\gamma\delta$  T cells in PBL cultures of different chicken lines. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2016;179:1-7. doi:10.1016/j.vetimm.2016.07.008
- 296. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. Int J Mol Sci. 2019;20(3). doi:10.3390/ijms20030649
- 297. Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu C-Y, et al. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1

cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(15):8427-8432. doi:10.1073/pnas.160197797

- 298. Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, Elvers S, Staeheli P, Kaspers B, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. J Interferon Cytokine Res. 2000;20(10):879-883. doi:10.1089/10799900050163244
- 299. Walliser I, Göbel TW. Chicken IL-17A is expressed in  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell subsets and binds to a receptor present on macrophages, and T cells. Dev Comp Immunol. 2018;81:44-53. doi:10.1016/j.dci.2017.11.004
- 300. Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV, et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. Front Immunol. 2013;4:456. doi:10.3389/fimmu.2013.00456
- 301. Migalska M, Sebastian A, Radwan J. Profiling of the TCRbeta repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. Sci Rep. 2018;8(1):11613. doi:10.1038/s41598-018-30037-0
- 302. Hammer SE, Leopold M, Prawits LM, Mair KH, Schwartz JC, Hammond JA, et al. Development of a RACE-based RNA-Seq approach to characterize the T-cell receptor repertoire of porcine gammadelta T cells. Dev Comp Immunol. 2020;105:103575. doi:10.1016/j.dci.2019.103575
- 303. Covacu R, Philip H, Jaronen M, Almeida J, Kenison JE, Darko S, et al. System-wide Analysis of the T Cell Response. Cell Rep. 2016;14(11):2733-2744. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.056
- 304. Li Z, Liu G, Tong Y, Zhang M, Xu Y, Qin L, et al. Comprehensive analysis of the T-cell receptor beta chain gene in rhesus monkey by high throughput sequencing. Sci Rep. 2015;5:10092. doi:10.1038/srep10092
- 305. Kivioja T, Vaharautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. Nat Methods. 2011;9(1):72-74. doi:10.1038/nmeth.1778
- 306. Islam S, Zeisel A, Joost S, La Manno G, Zajac P, Kasper M, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. Nat Methods. 2014;11(2):163-166. doi:10.1038/nmeth.2772
- 307. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. Nat Methods. 2014;11(6):653-655. doi:10.1038/nmeth.2960
- 308. Lefranc MP. IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System. Cold Spring Harb Protoc. 2011;2011(6):595-603. doi:10.1101/pdb.top115
- 309. Vernooij BT, Lenstra JA, Wang K, Hood L. Organization of the murine T-cell receptor gamma locus. Genomics. 1993;17(3):566-574. doi:10.1006/geno.1993.1373
- 310. Arden B, Clark S, Kabelitz D, Duncan G. Mouse T-cell receptor variable gene segment families. Immunogenetics. 1995;42:501-530. doi:10.1007/BF00172177
- 311. Bosc N, Lefranc M-P. The mouse (Mus musculus) T cell receptor alpha (TRA) and delta (TRD) variable genes. Developmental & Comparative Immunology. 2003;27(6):465-497. doi:10.1016/S0145-305X(03)00027-2
- 312. Le Page L, Gillespie A, Schwartz JC, Prawits LM, Schlerka A, Farrell CP, et al. Subpopulations of swine  $\gamma\delta$  T cells defined by TCR $\gamma$  and WC1 gene expression. Dev Comp Immunol. 2021;125:104214. doi:10.1016/j.dci.2021.104214
- 313. Uenishi H, Eguchi-Ogawa T, Toki D, Morozumi T, Tanaka-Matsuda M, Shinkai H, et al. Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR delta chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire. Mol Immunol. 2009;46(6):1212-1221. doi:10.1016/j.molimm.2008.11.010
- 314. Thome A, Saalmüller A, Pfaff E. Molecular cloning of porcine T cell receptor alpha, beta, gamma and delta chains using polymerase chain reaction fragments of the constant regions. Eur J Immunol. 1993;23(5):1005-1010. doi:10.1002/eji.1830230503
- 315. Havran WL, Jameson JM. Epidermal T cells and wound healing. J Immunol. 2010;184(10):5423-5428. doi:10.4049/jimmunol.0902733
- 316. Fichtner AS, Ravens S, Prinz I. Human gammadelta TCR Repertoires in Health and Disease. Cells. 2020;9(4). doi:10.3390/cells9040800

317. Davey MS, Willcox CR, Hunter S, Kasatskaya SA, Remmerswaal EBM, Salim M, et al. The human  $V\delta 2(+)$  T-cell compartment comprises distinct innate-like  $V\gamma 9(+)$  and adaptive  $V\gamma 9(-)$  subsets. Nat Commun. 2018;9(1):1760. doi:10.1038/s41467-018-04076-0

- 318. Liuzzi AR, McLaren JE, Price DA, Eberl M. Early innate responses to pathogens: pattern recognition by unconventional human T-cells. Curr Opin Immunol. 2015;36:31-37. doi:10.1016/j.coi.2015.06.002
- 319. Dimova T, Brouwer M, Gosselin F, Tassignon J, Leo O, Donner C, et al. Effector Vgamma9Vdelta2 T cells dominate the human fetal gammadelta T-cell repertoire. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(6):E556-565. doi:10.1073/pnas.1412058112
- 320. Eggesbø LM, Risnes LF, Neumann RS, Lundin KEA, Christophersen A, Sollid LM. Single-cell TCR sequencing of gut intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells reveals a vast and diverse repertoire in celiac disease. Mucosal Immunol. 2020;13(2):313-321. doi:10.1038/s41385-019-0222-9
- 321. Di Lorenzo B, Ravens S, Silva-Santos B. High-throughput analysis of the human thymic Vdelta1(+) T cell receptor repertoire. Sci Data. 2019;6(1):115. doi:10.1038/s41597-019-0118-2
- 322. Karunakaran MM, Göbel TW, Starick L, Walter L, Herrmann T. Vy9 and V $\delta$ 2 T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (BTN3) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (Vicugna pacos). Immunogenetics. 2014;66(4):243-254. doi:10.1007/s00251-014-0763-8
- 323. Ravens S, Schultze-Florey C, Raha S, Sandrock I, Drenker M, Oberdörfer L, et al. Human γδ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. Nat Immunol. 2017;18(4):393-401. doi:10.1038/ni.3686
- 324. Xi X, Han X, Li L, Zhao Z. γδ T cells response to Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis patients using preponderant complementary determinant region 3 sequence. Indian J Med Res. 2011;134(3):356-361.
- 325. Ding Y, Ma F, Wang Z, Li B. Characteristics of the V $\delta$ 2 CDR3 Sequence of Peripheral y $\delta$  T Cells in Patients with Pulmonary Tuberculosis and Identification of a New Tuberculosis-Related Antigen Peptide. Clin Vaccine Immunol. 2015;22(7):761-768. doi:10.1128/cvi.00612-14
- 326. Ogongo P, Steyn AJ, Karim F, Dullabh KJ, Awala I, Madansein R, et al. Differential skewing of donor-unrestricted and  $\gamma\delta$  T cell repertoires in tuberculosis-infected human lungs. J Clin Invest. 2020;130(1):214-230. doi:10.1172/jci130711
- 327. Déchanet J, Merville P, Lim A, Retière C, Pitard V, Lafarge X, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. J Clin Invest. 1999;103(10):1437-1449. doi:10.1172/jci5409
- 328. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, et al. Clonal selection in the human V $\delta$ 1 T cell repertoire indicates  $\gamma\delta$  TCR-dependent adaptive immune surveillance. Nat Commun. 2017;8:14760. doi:10.1038/ncomms14760
- 329. Pauza CD, Poonia B, Li H, Cairo C, Chaudhry S. γδ T Cells in HIV Disease: Past, Present, and Future. Frontiers in Immunology. 2015;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00687
- 330. Li H, Chaudhry S, Poonia B, Shao Y, Pauza CD. Depletion and dysfunction of  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells in HIV disease: mechanisms, impacts and therapeutic implications. Cell Mol Immunol. 2013;10(1):42-49. doi:10.1038/cmi.2012.50
- 331. Sant S, Jenkins MR, Dash P, Watson KA, Wang Z, Pizzolla A, et al. Human  $\gamma\delta$  T-cell receptor repertoire is shaped by influenza viruses, age and tissue compartmentalisation. Clin Transl Immunology. 2019;8(9):e1079. doi:10.1002/cti2.1079
- 332. Kallemeijn MJ, Kavelaars FG, van der Klift MY, Wolvers-Tettero ILM, Valk PJM, van Dongen JJM, et al. Next-Generation Sequencing Analysis of the Human TCR $\gamma\delta$ + T-Cell Repertoire Reveals Shifts in V $\gamma$  and V $\delta$ -Usage in Memory Populations upon Aging. Frontiers in Immunology. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00448
- 333. Gobel TW, Chen CH, Lahti J, Kubota T. Identification of T-cell receptor a-chain genes in the chicken. PNAS. 1994;91:1094-1098.
- 334. McCormack WT, Tjoelker LW, Stella G, Postema CE, Thompson CB. Chicken T-cell receptor betachain diversity: an evolutionarily conserved D beta-encoded glycine turn within the hypervariable CDR3 domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(17):7699-7703. doi:10.1073/pnas.88.17.7699

335. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med. 1992;176(5):1387-1398. doi:10.1084/jem.176.5.1387

- 336. Teng Q-Y, Zhou J-Y, Wu J-J, Guo J-Q, Shen H-G. Characterization of chicken interleukin 2 receptor  $\alpha$  chain, a homolog to mammalian CD25. FEBS Letters. 2006;580(17):4274-4281. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.044
- 337. Chiswick EL, Duffy E, Japp B, Remick D. Detection and quantification of cytokines and other biomarkers. Methods Mol Biol. 2012;844:15-30. doi:10.1007/978-1-61779-527-5 2
- 338. Balu S, Rothwell L, Kaiser P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-12. Vet Immunol Immunopathol. 2011;140(1-2):140-146. doi:10.1016/j.vetimm.2010.11.009
- 339. Rothwell L, Hamblin A, Kaiser P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. Vet Immunol Immunopathol. 2001;83(3-4):149-160. doi:10.1016/s0165-2427(01)00391-9
- 340. Miyamoto T, Lillehoj HS, Sohn EJ, Min W. Production and characterization of monoclonal antibodies detecting chicken interleukin-2 and the development of an antigen capture enzymelinked immunosorbent assay. Vet Immunol Immunopathol. 2001;80(3-4):245-257. doi:10.1016/s0165-2427(01)00273-2
- 341. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. Immunol Rev. 2009;229(1):173-191. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x
- 342. Hodge DL, Schill WB, Wang JM, Blanca I, Reynolds DA, Ortaldo JR, et al. IL-2 and IL-12 Alter NK Cell Responsiveness to IFN-γ-Inducible Protein 10 by Down-Regulating CXCR3 Expression1. The Journal of Immunology. 2002;168(12):6090-6098. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6090
- 343. Hou R, Goloubeva O, Neuberg DS, Strominger JL, Wilson SB. Interleukin-12 and interleukin-2-induced invariant natural killer T-cell cytokine secretion and perforin expression independent of T-cell receptor activation. Immunology. 2003;110(1):30-37. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01701.x
- 344. Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, et al. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. J Exp Med. 1992;175(3):779-788. doi:10.1084/jem.175.3.779
- 345. Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. J Immunol. 1992;149(11):3495-3502.
- 346. Linti AE, Göbel TW, Früh SP. Chicken  $\gamma\delta$  T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture. Frontiers in Immunology. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1325024
- 347. Naume B, Gately MK, Desai BB, Sundan A, Espevik T. Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. Cytokine. 1993;5(1):38-46. doi:10.1016/1043-4666(93)90022-w
- 348. Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdavifar S, Andersson L, Gaines H. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. J Immunol Methods. 2004;292(1-2):1-15. doi:10.1016/j.jim.2004.04.028
- 349. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(9):3834-3842. doi:10.3390/ijerph10093834
- 350. Lim PS, Sutton CR, Rao S. Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. Immunology. 2015;146(4):508-522. doi:10.1111/imm.12510
- 351. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood. 1994;84(12):4008-4027.

352. MacDonald HR, Budd RC, Howe RC. A CD3- subset of CD4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4+8+ cells. Eur J Immunol. 1988;18(4):519-523. doi:10.1002/eji.1830180405

- 353. Spetz AL, Kourilsky P, Larsson-Sciard EL. Induction of CD8 molecules on thymic gamma/delta T cells in vitro is dependent upon alpha/beta T cells. Eur J Immunol. 1991;21(11):2755-2759. doi:10.1002/eji.1830211116
- 354. Sinkora M, Sinkorova J, Holtmeier W. Development of gammadelta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. Immunology. 2005;115(4):544-555. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02194.x
- 355. Matz M, Shagin D, Bogdanova E, Britanova O, Lukyanov S, Diatchenko L, et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. Nucleic Acids Res. 1999;27(6):1558-1560. doi:10.1093/nar/27.6.1558
- 356. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-350. doi:10.1016/0076-6879(87)55023-6
- 357. Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nasim S, et al. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. J Med Virol. 1990;30(2):85-91. doi:10.1002/jmv.1890300202
- 358. Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. Genome Res. 2017;27(3):491-499. doi:10.1101/gr.209601.116
- 359. Aird D, Ross MG, Chen W-S, Danielsson M, Fennell T, Russ C, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. Genome Biology. 2011;12(2):R18. doi:10.1186/gb-2011-12-2-r18
- 360. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. Nat Rev Genet. 2014;15(2):121-132. doi:10.1038/nrg3642
- 361. Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. J Exp Med. 1994;179(1):323-328. doi:10.1084/jem.179.1.323
- 362. Kisielow J, Kopf M, Karjalainen K. SCART Scavenger Receptors Identify a Novel Subset of Adult γδ T Cells1. The Journal of Immunology. 2008;181(3):1710-1716. doi:10.4049/jimmunol.181.3.1710
- 363. Turchinovich G, Hayday AC. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon- $\gamma$ -secreting versus interleukin-17-secreting  $\gamma\delta$  T cells. Immunity. 2011;35(1):59-68. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.018
- 364. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(17):8175-8179. doi:10.1073/pnas.91.17.8175
- 365. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. Immunity. 1995;3(4):495-507. doi:10.1016/1074-7613(95)90178-7
- 366. Willcox CR, Davey MS, Willcox BE. Development and Selection of the Human  $V\gamma9V\delta2(+)$  T-Cell Repertoire. Front Immunol. 2018;9:1501. doi:10.3389/fimmu.2018.01501
- 367. Borst J, Wicherink A, Van Dongen JJ, De Vries E, Comans-Bitter WM, Wassenaar F, et al. Non-random expression of T cell receptor gamma and delta variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. Eur J Immunol. 1989;19(9):1559-1568. doi:10.1002/eji.1830190907
- 368. Mikulak J, Oriolo F, Bruni E, Roberto A, Colombo FS, Villa A, et al. NKp46-expressing human gutresident intraepithelial V $\delta$ 1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer. JCI Insight. 2019;4(24). doi:10.1172/jci.insight.125884
- 369. Mayassi T, Ladell K, Gudjonson H, McLaren JE, Shaw DG, Tran MT, et al. Chronic Inflammation Permanently Reshapes Tissue-Resident Immunity in Celiac Disease. Cell. 2019;176(5):967-981.e919. doi:10.1016/j.cell.2018.12.039
- 370. Davey MS, Willcox CR, Hunter S, Oo YH, Willcox BE. Vδ2+ T Cells—Two Subsets for the Price of One. Frontiers in Immunology. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02106

371. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. Immunogenetics. 1995;42(6):455-500. doi:10.1007/BF00172176

DANKSAGUNG 87

## 10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich zuallererst bei Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel bedanken, unter dessen Leitung ich diese Arbeit anfertigen durfte, und dessen großartige Betreuung und Unterstützung erheblich zu ihrem Gelingen beigetragen hat.

Auch bei Simon Früh, Ph.D., möchte ich mich bedanken, der mich stets mit wissenschaftlichen Ratschlägen und Methoden unterstützte, und dadurch großen Einfluss auf die erfolgreiche Durchführung so einiger Versuche hatte.

Außerdem danke ich der ganzen AG Immunologie, die mich immer unterstützte, sowohl fachlich als auch freundschaftlich, und mir ein tolles Umfeld während der Anfertigung meiner Arbeit bereitete.

Vor allem bedanke ich mich bei meiner Familie, ganz besonders bei meinen Eltern, die schon mein ganzes Leben für mich da waren und mich immer unterstützten, immer an mich glaubten, mir durch regelmäßige Telefonate Kraft und Zuversicht gaben, und mir während der Anfertigung dieser Arbeit stets hilfsbereit zur Seite standen.

Bei meinem Freund möchte ich mich dafür bedanken, dass er mit seinen Gedanken und Gebeten immer bei mir war, mich bei technischen Fragestellungen unterstützte, und auch in stressigen Phasen für Aufmunterung und Ablenkung sorgte.

Zu guter Letzt gilt mein Dank den Hühnern, die der essenzielle Bestandteil meiner Arbeit waren, und ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.