Charakterisierung eines Vγ3-spezifischen γδ-T-Zell-Markers des Haushuhns

von

Veronika Eva-Maria Drexel

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung eines Vγ3-spezifischen γδ-T-Zell-Markers des Haushuhns

von
Veronika Eva-Maria Drexel
aus Gauting

München 2025

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Gedruckt mit der 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
Korreferenten:	Prof. Dr. Herbert Kaltner Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 08. Februar 2025

Für meine lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG ... 1
2. LITERATURÜBERSICHT ... 3
2.1 Die Bedeutung von Hühnern in der Immunologie-Forschung ... 3
2.1.1 Die Historie der Immunologie-Forschung an Hühnern ... 3
2.1.2 Hühner in der heutigen Immunologie-Forschung ... 4
2.2 Das adaptive Immunsystem ... 5
2.2.1 Abgrenzung des adaptiven vom angeborenen Immunsystem ... 5
2.2.2 Die T-Lymphozyten und ihre Bestandteile ... 6
2.2.2.1 Einteilung der T-Lymphozyten ... 6
2.2.2.2 Die Struktur und Diversität der αβ- und γδ-T-Zell-Rezeptoren ... 7
2.2.2.3 Der CD3-Komplex bei Säuger und Haushuhn ... 9
2.2.2.4 Die Corezeptoren CD4 und CD8 bei Säuger und Haushuhn ... 10
2.3 γδ-T-Zellen des Säugers ... 12
2.3.1 Entwicklung der γδ-T-Zellen des Säugers ... 12
2.3.2 Lokalisation der γδ-T-Zellen des Säugers ... 13
2.3.3 Funktionen der γδ-T-Zellen des Säugers ... 15
2.4 γδ-T-Zellen des Huhns ... 18
2.4.1 Entwicklung der γδ-T-Zellen des Huhns ... 18
2.4.2 Lokalisation der γδ-T-Zellen des Huhns ... 19
2.4.3 Funktionen der γδ-T-Zellen des Huhns ... 19
2.4.4 γδ-TCR-Repertoire des Haushuhns im Vergleich zum Menschen ... 20
2.5 Monoklonale Antikörper gegen T-Zellen ... 23
2.5.1 Herstellung monoklonaler Antikörper ... 23
2.5.2 T-Zell Marker des Säugers ... 25
2.5.3 T-Zell Marker des Huhns ... 25
3. ZIELSETZUNG ... 27
4. PUBLIKATION ... 29
5. SUPPLEMENTARY MATERIAL ... 43
6. DISKUSSION ... 53
7. ZUSAMMENFASSUNG ... 61
8. SUMMARY ... 63
9. LITERATURVERZEICHNIS ... 65
10. DANKSAGUNG ... 79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau des humanen αβ- und des galliformen γδ-TCR-CD3-Komplexes 7

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Frequenzen der γδ-T-Zellen im Blut verschiedener Spezies 14
Tabelle 2: Auswahl an T-Zell-Markern verschiedener Spezies 24

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
APC	Antigen presenting cell
BCR	B cell receptor
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementary determining region
C-terminal	Carboxy-terminal
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DETC	Dendritic epidermal T cell
ET	Embryonaltag
Fab	Fragment antigen-binding
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
IEL	Intraepithelial lymphocyte
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunreceptor tyrosine-based activation motif
KGF	Keratinocyte growth factor
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
mAk	Monoklonaler Antikörper
MDV	Marek´s disease virus
MHC-I/-II	Major histocompatibility complex-I/-II
NDV	Newcastle disease virus
NGS	Next generation sequencing
NK	Natürliche Killerzelle
PBL	Peripheral blood lymphocyte
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pattern recognition receptor
RAG1/2	Recombination-activating gene 1/2
TCF-1	T cell factor 1
TCR	T cell receptor

TCR1	T cell receptor 1 (anti-γδ-TCR Antikörper)
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase
TGF-β	Transforming growth factor β
T_H	T helper cell
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
T_{reg}	Regulatory T cell
TRGV-/TRGJ-Segment	T cell receptor gamma V-/J-segment
TRDV-/TRDD-/TRDJ-Segment	T cell receptor delta V-/D-/J-segment
V/D/J/C	Variable/Diversity/Joining/Constant
WC1	Workshop cluster 1

1. EINLEITUNG

Die Immunsysteme von Säugetieren und Vögeln sind sehr ähnlich. Bei beiden Wirbeltierklassen wird das Immunsystem in eine angeborene und eine erworbene (adaptive) Immunantwort unterteilt. Während die angeborene Immunantwort als erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger fungiert, spielen B- und T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der adaptiven Immunabwehr. T-Lymphozyten können zudem basierend auf der Expression ihres T-Zell-Rezeptors (T cell receptor, TCR) in αβ- und γδ-T-Zellen differenziert werden (1, 2). Jede der vier TCR-Ketten, α-, β-, γ- und δ-Kette, besteht aus einer konstanten und einer variablen Region, wobei innerhalb der variablen Region die somatische Rekombination von verschiedenen V- (variable), D- (diversity; nur für TCRβ und TCRδ) und J- (joining) Genen eine große Vielfalt an αβ-T-Zellen und γδ-T-Zellen entstehen lässt (3, 4).

Im Vergleich zu B-Lymphozyten und αβ-T-Zellen sind γδ-T-Zellen bisher unzureichend charakterisiert. Diese Wissenslücke lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass hauptsächlich T-Zellen von Menschen, Mäusen und Ratten erforscht werden, die aber nur eine geringe Anzahl an γδ-T-Zellen im peripheren Blut aufweisen (5, 6). Hühner (*Gallus gallus domesticus*) hingegen gehören zu den Spezies mit einer hohen Frequenz an γδ-T-Zellen in der Peripherie, sie können bei ihnen bis zu 50% der gesamten T-Zell-Population in der Zirkulation ausmachen (7, 8). Deshalb bieten sich Hühner für die Erforschung der γδ-T-Zellen an.

Hühner haben sich längst als unentbehrliche Modelle in der Forschung etabliert. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden durch Experimente mit Hühnern grundlegende Erkenntnisse über Lymphozyten gewonnen, die zeigten, dass diese Zellen sowohl bei der Tumorabwehr als auch beim Schutz vor Infektionen wichtig sind (9, 10).

Angesichts der hohen Anzahl an γδ-T-Zellen in Hühnern ist davon auszugehen, dass diese Zellen im Immunsystem eine wesentliche Rolle spielen. Die spezifischen Funktionen dieser Zellen sind jedoch bisher weitgehend unbekannt, und auch eine bessere Charakterisierung potentieller Subtypen erfordert weitere Forschung. Hierfür sind allerdings spezifische γδ-T-Zell-Marker nötig. Bisher gibt es nur einen γδ-T-Zell-Marker für Hühner, den Klon TCR1, welcher alle γδ-T-Zellen zu erkennen scheint (11). Es wäre jedoch von Vorteil, weitere Marker zu etablieren, die nur bestimmte Vγ- oder Vδ-Familien erkennen, um die Verteilung der verschiedenen Subtypen in unterschiedlichen Organen untersuchen zu können und zudem die Veränderungen dieser Subtypen während Infektionen zu beurteilen.

In dieser Arbeit wird ein neuer hühnerspezifischer γδ-T-Zell-Marker beschrieben, der einen bestimmten TCR und somit nur eine Subpopulation von γδ-T-Zellen erkennt. Mit diesem Marker konnte auch die Expression dieses TCR in verschiedenen Geweben untersucht werden.

Eine kürzlich von Früh *et al.* (12) publizierte Annotation des Huxu-Hühnergenoms (13) ermöglichte durch eine Repertoire-Analyse von gesorteten Milzzellen die Identifikation des spezifischen TCR.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Die Bedeutung von Hühnern in der Immunologie-Forschung

2.1.1 Die Historie der Immunologie-Forschung an Hühnern

Vögel und Säugetiere haben sich vor über 250 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen reptilienartigen Vorfahren entwickelt, weshalb verschiedene auch das Immunsystem betreffende Eigenschaften identisch sind. Die Forschung arbeitet hauptsächlich mit Nager-Modellen, allerdings sind mittlerweile auch Haushühner (*Gallus gallus domesticus*) als Modell unabdingbar, weil diese einige Vorteile gegenüber Nagern bieten. Insbesondere sind die unterschiedlichen Embryonalstadien im Ei leicht zugänglich und die Embryos ausreichend groß für Manipulationen.

Das Huhn hat bezüglich der Immunologie-Forschung historischen Wert. Durch Experimente mit Hühnern und Hühnerembryonen wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts grundlegende Erkenntnisse über das Immunsystem erlangt (9, 14, 15). James Murphy fand schon damals heraus, dass Lymphozyten eine zentrale Rolle bei Immunantworten spielen, sowohl beim Schutz vor Infektionen als auch bei der Abstoßung von Gewebetransplantaten. Dieses Wissen blieb jedoch viele Jahre weitgehend unbeachtet, bis die Funktion der Lymphozyten Mitte des 20. Jahrhunderts durch Experimente mit anderen Spezies zu einem aktiven Forschungsthema wurde (10, 16-18). In dieser Zeit erkannte man auch, dass sich die Lymphozyten in zwei Zelltypen einteilen lassen, die in verschiedenen Organen reifen und unterschiedliche Funktionen haben (19-21). Den Thymus-abhängigen Geweben (T-Lymphozyten) wurden die zellulären und den Bursa-abhängigen Geweben (B-Lymphozyten) die humoralen Immunantworten zugeschrieben. Den entscheidenden Hinweis lieferten 1956 Glick *et al.* (22), die durch Experimente mit bursektomierten Hühnern und Infektionsversuchen mit *Salmonella typhimurium* eher zufällig entdeckten, dass die Bursa an der Antikörper-vermittelten Immunität beteiligt ist.

Die Bursa Fabricii wurde bereits im 17. Jahrhundert von Hieronymus Fabricius entdeckt, der jedoch zu der Zeit noch keine Aussage über ihre Funktion treffen konnte (23). Heute weiß man, dass die Bursa für die Entwicklung der antikörperproduzierenden B-Zellen notwendig ist. Im Säuger existiert dieses Organ zwar nicht, aber aufgrund der Ähnlichkeiten der lymphatischen Gewebe und Immunsysteme von Säugern und Hühnern war schnell klar, dass ein funktionales Äquivalent vorhanden sein muss (24), das später im Knochenmark gefunden wurde (25).

Auch bei der Entwicklung von Impfungen haben Hühner früher bereits eine bedeutende Rolle gespielt. Im 18. Jahrhundert begründete Edward Jenner die Ära der Impfungen, indem er entdeckte, dass eine Infektion mit dem Cowpox-Virus vor dem humanen Pockenvirus schützt und etablierte daraufhin die ersten Lebendimpfstoff-Vakzinationen (26). Louis Pasteur baute im 19. Jahrhundert dann auf diesem Wissen auf und stieß während seiner Forschungsarbeiten zur Geflügelcholera (*Pasteurella multocida*) auf den Effekt der attenuierten Impfstoffe (27). In den 1970er Jahren wurde für das Marek´s disease virus (MDV) erstmals ein Impfstoff gegen ein natürliches tumorerregendes Virus beim Huhn entwickelt (28). Auch bei der Entwicklung neuer Vakzine oder der Weiterentwicklung von bestehenden Impfstoffen wird immer wieder auf das Huhn zurückgegriffen, da die verschiedenen embryonalen Stadien gut zugänglich sind. So zeigten Sharma *et al.* in den 1990er Jahren, dass es möglich ist, Kükenembryonen zwischen dem 17. und 18. Bruttag durch eine *in ovo*-Impfung gegen MDV zu schützen (29, 30).

2.1.2 Hühner in der heutigen Immunologie-Forschung

Das Haushuhn ist aus der Immunologie-Forschung nicht mehr wegzudenken. Die Beschäftigung mit seinem Immunsystem führte in den letzten Jahren zu vielversprechenden Ergebnissen: Es wurde zum Beispiel vor 20 Jahren erstmals das komplette Hühnergenom sequenziert (31), es existieren mittlerweile einige TCR-Repertoire-Analysen, sowohl zu dem αβ-TCR als auch dem γδ-TCR (12, 32-34), und die ersten T-Zell-Knockout-Hühner wurden vor kurzem etabliert (35).

Diese Erkenntnisse ermöglichen weitere Untersuchungen der Hühner-Gene, insbesondere können auch die einzelnen T-Zell-Populationen näher charakterisiert und bezüglich ihrer Verteilung in den verschiedenen Geweben untersucht werden. Vor kurzem wurde zudem ein *in vitro* Langzeit-Kultursystem für γδ-T-Zellen veröffentlicht (34), was die weitere Erforschung dieser Zellen in Zukunft vereinfachen wird.

2.2 Das adaptive Immunsystem

2.2.1 Abgrenzung des adaptiven vom angeborenen Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in zwei Äste unterteilen, den Ast des angeborenen und den des erworbenen (adaptiven) Immunsystems. Beide verfolgen das gleiche Ziel, den Körper vor Pathogenen, also Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, zu schützen (36, 37). Dies wird durch verschiedene Komponenten erreicht. Primär werden Pathogene durch die anatomischen Barrieren Haut und Schleimhaut abgewehrt. Sollte ein Erreger diese jedoch durchdringen, verfügt das angeborene Immunsystem über weitere Abwehrmechanismen. Hierzu gehören das Komplementsystem, antimikrobielle Peptide und die angeborenen Immunzellen, wozu Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK) zählen. Das angeborene Immunsystem reagiert nicht antigenspezifisch, kann dafür aber einen sehr schnellen Schutz bieten, indem es innerhalb von wenigen Minuten aktiviert wird und zwischen körpereigen und körperfremd unterscheiden kann (38-41).

Das adaptive Immunsystem kommt zum Einsatz, sobald das angeborene überwunden wurde, und basiert auf einem fein abgestimmten Zusammenspiel zwischen antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cell, APC), wozu Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen zählen, sowie antigenspezifischen Lymphozyten. Dadurch wird eine gezieltere Bekämpfung verschiedener Pathogene ermöglicht. Diese Mechanismen benötigen allerdings auch mehr Zeit als die angeborenen, nämlich einige Stunden bis hin zu mehreren Tagen (39, 40, 42).

Innerhalb des adaptiven Immunsystems unterscheidet man zwei Arten von Lymphozyten, B- und T-Lymphozyten, die sich anhand ihrer antigenspezifischen Rezeptoren unterscheiden. B-Lymphozyten tragen B-Zell-Rezeptoren (B cell receptor, BCR) auf ihrer Oberfläche, T-Lymphozyten T-Zell-Rezeptoren (T cell receptor, TCR). Beide Rezeptoren kommen in membrangebundener, der BCR jedoch auch in sezernierter Form, den Antikörpern, vor. Die Entwicklung von Lymphozyten beginnt in den primären lymphatischen Organen. Im Knochenmark werden Vorläuferzellen gebildet, die dann im Falle der B-Zellen der Säuger auch hier reifen, B-Zellen der Vögel hingegen wandern in die Bursa Fabricii und reifen dort. Die T-Zellen der Säuger und Vögel gelangen vom Knochenmark in den Thymus, um dort ihre Reifung zu vollziehen. Die ausgereiften, zu dieser Zeit noch naiven Lymphozyten erreichen dann über die Blutlaufbahn die sekundären lymphatischen Organe und zirkulieren durch das Lymphsystem, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Nach dem ersten Antigenkontakt spricht man dann nicht mehr von naiven, sondern von Effektor-Lymphozyten (37, 43).

T-Lymphozyten sind verantwortlich für die zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems und lassen sich anhand ihrer Effektorfunktionen oder ihres TCR weiter einteilen (44), worauf im nächsten Unterkapitel eingegangen wird. B-Lymphozyten hingegen stellen die humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems dar. Sobald eine ausgereifte B-Zelle Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hat, entwickeln sich Plasmazellen, die Antikörper spezifisch gegen dieses Antigen produzieren und sezernieren (45). Der BCR und die sezernierten Antikörper sind in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Strukturen zu erkennen und können direkt an Antigene wie Proteine, Glykoproteine oder Polysaccharide binden. Im Gegensatz dazu ist der TCR bei seiner Antigen-Erkennung spezifischer, da er im Wesentlichen nur Proteinantigene erkennt, die auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) präsentiert werden, und somit überwiegend einer MHC-Restriktion unterliegt. Der MHC präsentiert auf der Zelloberfläche Bestandteile des Pathogens, und der TCR muss meist sowohl das präsentierte Antigen als auch Teile des MHC-Moleküls erkennen (1, 46).

Ein weiteres zentrales Merkmal der adaptiven Immunität ist die Bildung immunologischer Gedächtniszellen. Nach einem ersten Kontakt mit einem Antigen, also einer Infektion mit einem bestimmten Erreger, wird ein Teil der aktivierten Lymphozyten zu langlebigen T- und B-Gedächtniszellen differenziert. Bei erneuter Exposition gegenüber diesem Pathogen können die Gedächtniszellen schnell aktiviert werden, was zu einer rascheren und effizienteren Schutzreaktion führt (37, 47).

2.2.2 Die T-Lymphozyten und ihre Bestandteile

2.2.2.1 Einteilung der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten können anhand ihrer Effektorfunktionen in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden, die T-Helfer-Zellen (T helper cell, T_H), die zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T lymphocyte, CTL) und die regulatorischen T-Zellen (regulatory T cell, T_{reg}). T_H regulieren durch die Freisetzung von Zytokinen die Reaktion anderer Effektorzellen, wie Makrophagen und B-Zellen. Man unterscheidet drei Arten: T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen, welche unterschiedliche Zytokine ausschütten und von verschiedenen Transkriptionsfaktoren abhängig sind. CTL können mithilfe ihrer zytotoxischen Granula infizierte Zellen abtöten, T_{reg} unterdrücken überschießende Immunantworten und verhindern somit beispielsweise Autoimmunreaktionen (48-50).

T-Lymphozyten können neben der funktionellen Einteilung auch anhand ihres Rezeptors in αβ- und γδ-T-Zellen unterschieden werden. Der TCR ist ein membrangebundener Proteinkomplex, der sich aus zwei Polypeptidketten zusammensetzt und entweder den

Rezeptor der αβ- oder der γδ-T-Zellen bildet, je nachdem, ob der TCR aus einer alpha- (TCRα) und einer beta- (TCRβ) Kette zusammengesetzt ist, oder aber aus einer gamma- (TCRγ) und einer delta- (TCRδ) Kette (1, 2, 51, 52). Während die Funktionen der αβ-T-Zellen schon weitgehend bekannt sind, ist das Wissen über die γδ-T-Zellen aktuell noch sehr beschränkt.

2.2.2.2 Die Struktur und Diversität der αβ- und γδ-T-Zell-Rezeptoren

Der TCR ist dem Fab-Fragment (fragment antigen-binding) eines Immunglobulins (Ig) strukturell sehr ähnlich, unterscheidet sich aber in der Anzahl der Antigenbindungsstellen und der vorliegenden Form. Während der BCR zwei Antigenbindungsstellen aufweist und auch sezerniert vorliegt, hat der TCR nur eine Antigenbindungsstelle und liegt ausschließlich membrangebunden vor. Die Strukturen der beiden T-Zell-Rezeptoren sind sehr ähnlich, wobei der γδ-TCR insgesamt kleiner ist als der Rezeptor der αβ-T-Zellen. Die CDR3-Schleife des γδ-TCR ist jedoch länger und kann somit vermutlich direkt mit dem Liganden interagieren und erhöht zusätzlich die Diversität des Rezeptors (37, 43).

Der TCR beider T-Zelltypen stellt ein Heterodimer dar, welches aus zwei Transmembran-glykoproteinketten, TCRα und TCRβ oder TCRγ und TCRδ, besteht, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. In Abbildung 1 ist links der schematische Aufbau des humanen αβ-TCR (grün) und rechts der des galliformen γδ-TCR (blau) dargestellt. Jede der vier Ketten beinhaltet eine Transmembrandomäne, die die Verankerung in der Zellmembran sicherstellt. Intrazellulär schließt sich eine kurze C-terminale zytoplasmatische Region an, während sich die extrazelluläre Domäne in zwei funktionelle Regionen unterteilen lässt: die membrannahe konstante (C-) Region, die strukturelle Stabilität bietet, sowie die membranferne variable (V-) Region, die an der Antigenerkennung beteiligt ist (53).

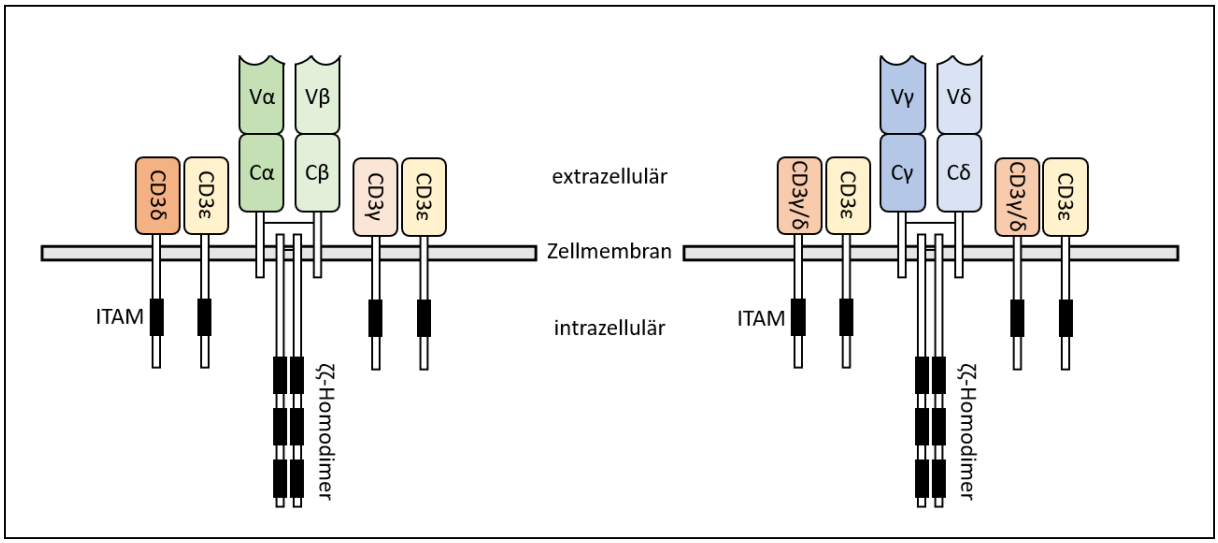


Abbildung 1: Aufbau des humanen αβ- und des galliformen γδ-TCR-CD3-Komplexes

Die V-Region setzt sich aus den V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Genen zusammen, wobei die V- und J-Segmente in allen TCR-Loci enthalten sind, die D-Segmente hingegen ausschließlich in den β- und δ-Loci. Die Antigenbindungsstelle liegt innerhalb der variablen Region und setzt sich aus drei hypervariablen Schleifen (complementary determining region, CDR) zusammen: CDR1, CDR2 und CDR3. CDR3 wird von den Verknüpfungsstellen der V(D)J-Gene gebildet und zeigt dadurch eine enorme Variabilität; aus diesem Grund können die TCR eine große Bandbreite von Antigenen erkennen (54).

Während der Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus werden die V(D)J-Gensegmente der Rezeptoren antigenunabhängig angeordnet und kombiniert, um so einzigartige und hochdiverse V-Regionen und dementsprechend verschiedene spezifische funktionelle Antigenrezeptoren zu erzeugen. Dieser Prozess wird als somatische Rekombination oder V(D)J-Rekombination bezeichnet und ist von dem Enzymkomplex V(D)J-Rekombinase abhängig, welcher aus den Proteinen besteht, die von den rekombinationsaktivierenden Genen 1 und 2 (recombination-activating gene 1 and 2, RAG1 und RAG2) kodiert werden (55). Die beiden RAG wurden auch schon beim Huhn beschrieben (56). Um die Vielfalt des TCR-Repertoires zu erlangen, gibt es neben der bereits beschriebenen kombinatorischen Diversität auch eine junktionale Diversität. Diese entsteht während des Rekombinationsvorgangs durch das Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen zwischen den verschiedenen Gensegmenten. Das Enzym, das für diesen Prozess notwendig ist, ist die terminale Desoxyribonucleotidyltransferase (TdT), die ebenfalls Teil des Rekombinasekomplexes ist und beim Huhn bereits charakterisiert wurde (57). Nach erfolgter V(D)J-Rekombination wird schließlich noch ein C-Gen integriert. Neben der kombinatorischen und junktionalen Diversität führt auch das zufällige Zusammenfügen der unterschiedlichen α- und β- oder γ- und δ-Ketten auf der Zelloberfläche zu einer TCR-Vielfalt. Die Modifizierung des TCR ist mit der Reifung des T-Lymphozyten im Thymus abgeschlossen (37, 43).

Die Gene der verschiedenen TCR-Ketten sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, wobei die V-Gensegmente am 5´-Ende und die C-Gensegmente am 3´-Ende liegen, dazwischen befinden sich die D- und J-Gensegmente. Beim Huhn sind die TCRγ-VJ-Gene auf Chromosom 2 (58, 59), die TCRβ-VDJ-Gene auf Chromosom 1 (59, 60) und die TCRα/δ-Gene gemeinsam auf Chromosom 27. Außerdem wurde bei galliformen Vögeln ein weiterer TCRδ-Locus auf Chromosom 10 entdeckt, der aus einem einzelnen Satz von VDJC-Genen besteht (61). Die humanen TCRγ- und TCRβ-Gene befinden sich auf Chromosom 7, während die TCRα/δ-Gene auf Chromosom 14 lokalisiert sind (62-64).

Nachdem die TCRα/δ-Gene bei Säuger und Huhn auf einem Chromosom liegen, und sich die δ-Gene innerhalb der TCRα-Genregion befinden, wird die Expression von einem αβ-TCR oder γδ-TCR darüber reguliert, ob es während der Gen-Umlagerung zur Deletion der δ-Gene kommt oder nicht (65). Bei einer initialen Rekombination von δ-Genen bleibt die α-Genregion zwar erhalten, die T-Zelle wird aber letztendlich einen γδ-T-Zell-Rezeptor exprimieren. Im Gegensatz dazu kommt es während der Rekombination der α-Gene meist zu einer Deletion des TCRδ-Locus, und es entsteht eine T-Zelle, die einen αβ-TCR exprimiert. Einige Vα-Gene können allerdings nicht nur mit Jα-, sondern auch mit einem, beiden oder keinem Dδ-Gensegment, und mit einem der beiden Jδ-Genen kombiniert werden, wodurch die Rekombinationsmöglichkeiten und damit auch die Diversität des TCR erhöht wird. Dieses Phänomen ist sowohl beim Menschen (66-68) als auch beim Huhn (69, 70) bekannt.

2.2.2.3 Der CD3-Komplex bei Säuger und Haushuhn

Aufgrund des kurzen zytoplasmatischen Bereichs des TCR, der keine enzymatische Aktivität aufweist, ist dieser allein nicht in der Lage, die Signalübertragung ins Zellinnere effektiv zu vermitteln. Deshalb liegt dieser Rezeptor immer zusammen mit einem CD3-Komplex vor (s. Abbildung 1), der sicherstellt, dass die Antigenbindung des TCR eine effektive Signaltransduktion auslöst, die zur Aktivierung der Zelle führt. Folglich tragen alle T-Zellen diesen Komplex assoziiert mit dem TCR auf ihrer Oberfläche und sind dementsprechend als CD3-positiv charakterisiert (71). Dem CD3-Komplex werden somit drei wichtige Funktionen zugeschrieben: Erst durch seine Anlagerung an den TCR wird dieser funktionsfähig, er reguliert die Oberflächenexpression dieses Rezeptors und ist zuständig für die Signalweiterleitung, sobald ein Antigen erkannt wurde (72, 73).

Der humane CD3-Komplex ist zusammen mit dem αβ-TCR in Abbildung 1 (linker Komplex) schematisch dargestellt. Es gibt vier CD3-Ketten, die durch die gamma- (γ-), delta- (δ-), epsilon- (ε-) und zeta- (ζ-) Gene codiert werden, wobei die ζ-Ketten immer ζζ-Homodimere darstellen. Zusätzlich zu diesem Homodimer entstehen zwei weitere Dimere, welche durch Zusammensetzen der unterschiedlichen CD3-Ketten gebildet werden: CD3γε- und CD3δε-Heterodimere (72, 74, 75). Bei der Entstehung eines αβ-TCR-CD3-Komplexes lagert sich ein ζζ-Homodimer gemeinsam mit einem CD3γε- und einem CD3δε-Heterodimer an den αβ-TCR an. Dagegen enthalten die γδ-TCR-CD3-Komplexe des Säugers (nicht abgebildet) fast ausschließlich eine Kombination von ζζ-Homodimeren und CD3γε-Heterodimeren, aber kaum CD3δε-Heterodimere (76, 77). Die CD3-Dimere sind nicht-kovalent mit dem TCR auf der T-Zell-Oberfläche verbunden. Während der Transmembranbereich des CD3-Komplexes für die Anordnung des TCR wichtig ist, beinhaltet die intrazelluläre Domäne Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (immunreceptor tyrosine-based activation motiv, ITAM), welche

essenziell für die Signal-transduktion vom TCR in die Zelle sind und so zur T-Zell-Aktivierung führen (37). Die γ-, δ- und ε-Ketten weisen jeweils nur ein ITAM auf, während in jeder ζ-Kette drei ITAM vorhanden sind. Nach der Stimulation des TCR durch ein Antigen werden die Tyrosinreste in den ITAM durch Tyrosinkinasen phosphoryliert, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die zur Aktivierung des T-Lymphozyten führt (78).

Beim Huhn existieren im Gegensatz zum Säuger nur zwei CD3-Gene: ein CD3ε- und ein CD3γ/δ-Gen, die große Ähnlichkeiten zu ihren Säuger-Pendants aufweisen (79-81) und im γδ-TCR-CD3-Komplex (wie auch im αβ-TCR-CD3-Komplex) zwei Heterodimere bilden (s. Abbildung 1, rechter Komplex). Ein weiterer wichtiger Bestandteil dieses Komplexes ist ebenfalls das ζζ-Homodimer, ein Adaptor-Molekül, das von den CD3-Genen gebunden wird (82). Der zytoplasmatische Bereich dieses Homodimers enthält drei ITAM, die während der Zellaktivierung phosphoryliert werden und somit weiterführende Signale vermitteln. Das ζζ-Homodimer des Huhns ist sogar in der Lage, sich mit dem Säuger-TCR zu verbinden und dessen Funktion wiederherzustellen (83).

Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen CD3-Gene durch eine schrittweise Evolution aus einer gemeinsamen Vorläuferform entstanden sind (84, 85). Das ursprüngliche CD3-Gen wurde demnach dupliziert und formte dadurch die Gene CD3γ/δ und CD3ε, die in Fischen (86, 87), Amphibien (88) und Hühnern vorhanden sind. Beim Säuger fand daraufhin vermutlich noch eine weitere Duplikation statt, die CD3γ und CD3δ entstehen ließ (89).

2.2.2.4 Die Corezeptoren CD4 und CD8 bei Säuger und Haushuhn

CD4 und CD8 sind wesentliche Bestandteile eines funktionellen TCR-Komplexes, da diese beiden Corezeptoren durch Bindung an die MHC-Moleküle die Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosinkinase (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Lck) in die Nähe des ITAM bringen. Dieses Enzym ist an die zytoplasmatischen Domänen der CD4- und CD8-Moleküle gebunden und entscheidend für die Phosphorylierung des ITAM, was wiederum notwendig für die weitere Signalkaskade ist (37). Diese beiden Corezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen wurden sowohl beim Säuger als auch beim Huhn nachgewiesen (90) und zeigen bezüglich Struktur und Funktion große Ähnlichkeiten (91, 92). CD4 wird von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert und bindet an MHC-II-Moleküle, die von den meisten APC exprimiert werden. Dagegen wird CD8 von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und erkennt MHC-I-Moleküle, die auf nahezu allen kernhaltigen Zellen zu finden sind (43, 93).

Der CD4-Corezeptor ist bei Säugern ein einkettiges Molekül, das aus vier immunglobulinähnlichen Domänen besteht, wobei die MHC-bindende Region auf der D_1-Domäne liegt. Sowohl das CD4-Molekül als auch der TCR binden gleichzeitig an denselben

Peptid:MHC-II-Komplex; dabei wird durch CD4 die Empfindlichkeit einer T-Zelle für das Antigen erhöht. Der intrazelluläre Teil von CD4 bindet an die zytoplasmatische Tyrosinkinase Lck, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Signalkaskade nach einer Antigenerkennung spielt (37).

Beim Huhn besteht der CD4-Corezeptor ebenfalls aus nur einer Kette, die vier extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen und eine zytoplasmatische Domäne mit der Bindungsstelle für Lck enthält (43).

Der CD8-Corezeptor ist bei Säugern ein Dimer mit zwei unterschiedlichen Ketten (α und β), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Beide Ketten enthalten je eine immunglobulinähnliche Domäne. Es existieren CD8αα-Homodimere und CD8αβ-Heterodimere, wobei die Homodimere seltener vorkommen. Auch das CD8-Molekül bindet zusammen mit TCR1 denselben Peptid:MHC-I-Komplex und erhöht durch seine Bindung an die Lck die Empfindlichkeit der T-Zellen für Antigene, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden (37). CD8 exprimierende γδ-T-Zellen wurden in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Beim Menschen tragen diesen Corezeptor in der Milz etwa 50% der γδ-T-Zellen, im Blut aber nur bis zu 30% (94). Bei der Maus wurden CD8-positive γδ-T-Zellen zusätzlich im Darmepithel nachgewiesen (95). Auch zum Schwein gibt es bereits Studien, die zeigen, dass sowohl CD8-positive als auch CD8-negative γδ-T-Zellen existieren (96).

Wie beim Säuger stellt sich beim Huhn der CD8-Corezeptor als Dimer dar, bestehend aus der α- und der β-Kette, die jeweils eine V-ähnliche Immunglobulin-Domäne enthalten; allerdings weist nur die CD8α-Kette eine Lck-Bindungsstelle auf. Die Ketten können zwei verschiedene Isoformen bilden: CD8αα-Homodimere und CD8αβ-Heterodimere (97). Grundsätzlich finden sich nur wenige CD8-positive γδ-T-Zellen im Blut von Hühnern, in Milz und Darm hingegen exprimiert die Mehrheit der γδ-T-Zellen CD8 (11, 34, 98). Ähnlich wie beim Säuger tragen die meisten T-Lymphozyten von Hühnern das CD8αβ-Heterodimer auf ihrer Oberfläche. Bei jungen Hühnern gibt es jedoch in der Milz und im Darm auch eine Population von γδ-T-Zellen, die CD8αα-Homodimere exprimieren (37). Während die meisten Hühnerlinien in der Peripherie entweder nur CD4 oder CD8 auf der T-Zell-Oberfläche exprimieren, gibt es Hinweise darauf, dass in einigen Hühnerlinien eine Koexpression beider Moleküle auf einem erheblichen Teil der peripheren T-Zellen vorkommt (99).

2.3 γδ-T-Zellen des Säugers

2.3.1 Entwicklung der γδ-T-Zellen des Säugers

T-Lymphozyten entstehen im Thymus aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen, die ursprünglich aus dem Knochenmark stammen. Während ihrer Entwicklung im Thymus werden sie als Thymozyten bezeichnet. Beim Menschen ist die Entwicklung des Thymus mit der Geburt abgeschlossen, bei der Maus hingegen erst nach einigen Lebenswochen (37). Ein entscheidender Schritt bei der Differenzierung von T-Zellen ist die Interaktion mit dem Notch1-Rezeptor, der auf den Thymusepithelzellen exprimiert wird. Dadurch wird die Vorläuferzelle auf die T-Zell-Entwicklung festgelegt und eine alternative Differenzierung, wie beispielsweise zur B-Zelle, verhindert. Die Signalübertragung über Notch1 führt zur Expression T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie des T-Zell-Faktors 1 (T cell factor 1, TCF-1), GATA-3 (100) und des IL-7-Rezeptors (101). γδ-T-Zellen entwickeln sich bereits vor den αβ-T-Zellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, die primär CD4- und CD8-negativ ist, und daher als doppelt negative Vorläuferzelle bezeichnet wird. Während sich αβ-T-Zellen über ein doppelt-positives Stadium zu den finalen CD4- oder CD8-einfach-positiven Zellen entwickeln, bleiben die γδ-T-Zellen größtenteils doppelt negativ (102-104). Wie bereits in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben, existieren jedoch auch einige CD8-positive γδ-T-Zellen bei den unterschiedlichen Spezies.

Es ist bekannt, dass sich die einzelnen Ketten der γδ-TCR aus unterschiedlichen Gensegmenten zusammensetzen: Die γ-Ketten bestehen aus verschiedenen V- und J-Segmenten, die δ-Ketten zusätzlich aus einem D-Segment. Die diversen γδ-T-Zell-Subtypen entstehen in bestimmten Entwicklungsphasen der Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit und sind vor allem durch die Expression charakteristischer Vγ- und Vδ-Gensegmente definiert. Sie verlassen den Thymus zu bestimmten Zeitpunkten, um in ihre jeweiligen Zielgewebe einzuwandern (105-109). Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus sind γδ-T-Zellen die ersten T-Zellen, die in der Peripherie zu finden sind. Die Subtypen reifer γδ-T-Zellen werden beim Menschen bevorzugt über ihre δ-Ketten, bei der Maus überwiegend anhand ihrer γ-Ketten differenziert.

Über die unterschiedlichen Differenzierungswellen und die Lokalisation der einzelnen Zellpopulationen bei der Maus ist Folgendes bekannt: $V\gamma5^+$ Zellen sind die ersten, die während der Embryonalphase gebildet werden und den Thymus ab dem 13. Trächtigkeitstag verlassen. Diese Zellen wandern in die Epidermis ein, wo sie lebenslang bleiben und sich lokal vermehren, und werden als DETC (dendritic epidermal T cell) bezeichnet (110, 111). In einer zweiten Welle findet im frühen fetalen Thymus die Entwicklung der $V\gamma6^+$ Zellen statt, sie beginnt ab dem 14. Trächtigkeitstag, und die Auswanderung dauert bis zur Geburt an; diese Zellen reichern sich vor allem in den Epithelien von Uterus, Vagina, Zunge (112) und Lunge an (113). $V\gamma1^+$ und $V\gamma4^+$

γδ-T-Zellen verlassen den Thymus dann in der dritten Welle ab dem 16. Trächtigkeitstag. Erstere wandern vor allem in die Leber und die Milz ein (114), letztere wurden in allen lymphatischen Organen gefunden (112). Während $Vγ5^+$ und $Vγ6^+$ Zellen ausschließlich vom fetalen Thymus gebildet werden, entwickeln sich $Vγ1^+$ und $Vγ4^+$ Zellen auch im adulten Thymus. $Vγ7^+$ Zellen finden sich in adulten Mäusen vor allem im Dünndarm-Epithel und entstehen vermutlich außerhalb des Thymus (109, 115). Bezüglich der verwendeten Nomenklaturen bestehen Unterschiede: Während in den meisten Publikationen, wie auch in diesem Abschnitt, die Nomenklatur von Heilig und Tonegawa (116) verwendet wird, greifen beispielsweise Xiong und Raulet (105) auf die Nomenklatur von Garman *et al.* (117) zurück. Nach dieser werden $Vγ5^+$ Zellen als $Vγ3^+$, $Vγ6^+$ Zellen als $Vγ4^+$, und $Vγ7^+$ Zellen als $Vγ5^+$ bezeichnet.

Die humanen γδ-T-Zellen lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen, die $Vγ9^+Vδ2^+$ und die $Vγ9^+Vδ2^-$ Zellen, welche sich unter anderem in den Zeitpunkten ihrer Entwicklung und ihrer finalen Gewebelokalisation unterscheiden. $Vγ9^+Vδ2^+$ Zellen entwickeln sich primär etwa fünf bis acht Wochen nach der Befruchtung in der fetalen Leber und werden im weiteren Verlauf der Schwangerschaft im Thymus generiert (118, 119). Zudem wurde eine postnatale Entstehungswelle dieser Zellen im Thymus entdeckt (120). $Vγ9^+Vδ2^+$ Zellen machen im adulten Menschen den überwiegenden Anteil der γδ-T-Zellen im Blut aus (120). Über $Vγ9^+Vδ2^-$ Zellen ist beispielsweise bekannt, dass $Vδ1^+$ Zellen ab Mitte der Schwangerschaft die dominierende Thymozytenpopulation darstellen, sie werden auch nach der Geburt bis ins frühe Erwachsenenalter im Thymus gebildet (121).

Die in der frühen fetalen Phase entstehenden murinen $Vγ5^+$ und $Vγ6^+$ und die humanen $Vγ9^+Vδ2^+$ Zellen sind im Gegensatz zu den adulten T-Zellen durch einen invarianten TCR gekennzeichnet (106, 120). Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die TdT in Thymozyten erst im Laufe der Embryonalzeit exprimiert wird, und die Expression postnatal kontinuierlich zunimmt (121).

2.3.2 Lokalisation der γδ-T-Zellen des Säugers

Neben αβ-T-Zellen kommen auch γδ-T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben aller Vertebraten vor, jedoch befinden sie sich hauptsächlich in den Epithelien verschiedener Gewebe, wie der Haut, dem weiblichen Genitaltrakt und dem Intestinum, wo sie als erste Verteidigungslinie, der „first line of defense“, fungieren (5, 122). Die Diversität des γδ-TCR der Zellen, die diese Bereiche besiedeln, ist viel eingeschränkter als die der Rezeptoren der γδ-T-Zellen, die sich in den sekundären lymphatischen Organen befinden. Diese Repertoire-

Einschränkung scheint es der T-Zelle zu ermöglichen, spezielle Liganden dieser Bereiche zu erkennen (123), worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird.

γδ-T-Zellen wurden bereits bei vielen Säugern beschrieben, wobei man zwei Gruppen unterscheidet: Spezies mit einer hohen und einer niedrigen Frequenz an γδ-T-Zellen. Die Grenze wird dabei bei einem Anteil von 10% der gesamten T-Zellzahl im peripheren Blut gezogen. Zu den Spezies mit einem geringen Anteil an γδ-T-Zellen zählen Mensch, Maus (5, 6) und Hund (124). Dagegen gehören Ziege (125), Rind, Schaf (126, 127), Schwein (128) und Hase (129) zu den Spezies mit einem hohen Anteil an γδ-T-Zellen.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Frequenzen der γδ-T-Zellen im Blut verschiedener Spezies. Beim Menschen wurden 0,5-10% γδ-T-Zellen im Blut gefunden, wobei der Durchschnitt bei etwa 3% liegt (130). Bei der Maus sind es 1-4% im Blut, in den verschiedenen Geweben wurden allerdings vermehrt γδ-T-Zellen identifiziert (103): So exprimieren im Reproduktionstrakt 10-20% und in den intestinalen Epithelien 20-40% der T-Zellen einen γδ-TCR. In der Haut der Maus befinden sich 50-70% γδ-T-Zellen, wobei diese hauptsächlich als DETC beschrieben sind, die alle einen identischen Rezeptor tragen (111). DETC-ähnliche γδ-T-Zellen wurden auch bei Ratten beschrieben, jedoch sonst bei keiner anderen Tierart. Beim Hund können die γδ-T-Zellen im Blut knapp 5% ausmachen (124). Bei den Tierarten mit einem hohen Anteil an γδ-T-Zellen kann die Frequenz je nach Alter variieren. Die Altersabhängigkeit wurde zum Beispiel bei Schwein und Schaf beschrieben, wobei der Anteil der γδ-T-Zellen bei beiden Tierarten bis zu 50% der peripheren T-Zellen betragen kann (127, 131, 132). Bei der Ziege wurden 4-20% der T-Zellen im peripheren Blut als γδ-T-Zellen identifiziert (125), beim Rind 20-40% (126) und beim Hasen etwa 20% (129).

Spezies	Frequenz der γδ-T-Zellen	Referenz
Mensch	0,5 – 10 %	Lanier und Weiss (130)
Maus	1 – 4 %	Chien *et al.* (103)
Hund	0,5 – 5 %	Faldyna *et al.* (124)
Ziege	4 – 20 %	Caro *et al.* (125)
Rind	20 – 40 %	Mackay und Hein (126)
Schaf	15 – 50 %	Hein und Mackay (131)
Schwein	12 – 49 %	Hirt *et al.* (132)
Hase	ca. 20 %	Su *et al.* (129)
Huhn	15 – 50 %	Sowder *et al.* (7) Cihak *et al.* (8)

Tabelle 1: Frequenzen der γδ-T-Zellen im Blut verschiedener Spezies

Es ist bekannt, dass αβ-T-Zellen nach Verlassen des Thymus in die sekundären lymphatischen Organe wandern. Für γδ-T-Zellen trifft das nur teilweise zu. Die Mehrheit dieser Zellen gelangt direkt in Barrieregewebe. Beim Menschen sind sie daher nach der Geburt nur in geringer Zahl im peripheren Blut, im Thymus, in der Milz und den Lymphknoten vertreten, während sie im Hautepithel sowie in den Schleimhäuten des Verdauungs- und Reproduktionstraktes häufiger vorkommen (133). Beim Schwein lassen sich γδ-T-Zellen in CD2-positive und CD2-negative Zellen unterteilen, wobei CD2-negative vorrangig im Blut und CD2-positive in verschiedenen Organen zu finden sind (134). Im Gegensatz dazu gibt es bei Mensch und Maus keine Hinweise auf eine CD2-negative Population im Blut. Beim Rind sind γδ-T-Zellen vor allem in den Epithelien von Haut und Darm angesiedelt, in geringerer Anzahl auch in Lymphknoten (126). Beim Schaf befinden sich γδ-T-Zellen überwiegend im Darmepithel und, wie bei der Ziege auch, in der Haut, interessanterweise vor allem an wollarmen Körperstellen (131).

Bei Mensch und Maus konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass bestimmte Subpopulationen von γδ-T-Zellen bevorzugt in bestimmten Organen und Geweben vorkommen (135). Ihre spezifische Verteilung deutet darauf hin, dass sie dort spezifische Funktionen übernehmen. Die γδ-T-Zellen im menschlichen peripheren Blut exprimieren vor allem Vγ9- und Vδ2-Ketten (120). γδ-T-Zellen, die andere Ketten als Vγ9 und Vδ2 exprimieren, werden als nicht-Vγ9Vδ2$^+$ T-Zellen bezeichnet und sind bevorzugt in den verschiedenen soliden Organen lokalisiert. Hierzu zählen unter anderem die Vγ9$^-$Vδ2$^+$ T-Zellen, die vermehrt in der humanen Leber gefunden wurden (136), und die Vδ1$^+$ T-Zellen, die beim Menschen in der Milz, Leber, Haut und auch im Darmepithel vertreten sind (133). Bei der Maus dominieren im peripheren Blut Vγ1$^+$ Zellen, im Darmepithel wurden vor allem Vγ7$^+$ Zellen und in der Epidermis Vγ5$^+$ Zellen gefunden (135). Die Vγ4$^+$ und Vγ6$^+$ Zellen sind vor allem in den Epithelien des weiblichen Reproduktionstrakts lokalisiert (112, 133).

2.3.3 Funktionen der γδ-T-Zellen des Säugers

Neben einer im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen zirkulierenden γδ-T-Zell-Population, welche hauptsächlich der adaptiven Immunität zugeordnet werden kann, wandern die meisten γδ-T-Zellen direkt ins Gewebe. Sie sind vorrangig in epithelialen Geweben wie der Haut, dem Darm und dem weiblichen Reproduktionstrakt lokalisiert, und weichen funktionell stark von den zirkulierenden Zellen ab, indem sie bei der „first line of defense“ mitwirken und somit dem angeborenen Immunsystem zugeteilt werden können (5, 122). Zusätzlich zu dem γδ-TCR tragen einige γδ-T-Zellen auch Rezeptoren vom angeborenen Typ, wie verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptor, PRR), die wahrscheinlich zu ihrer fein abgestimmten Wahrnehmung der Gewebemikroumgebung beitragen. Sie exprimieren Toll-like Rezeptoren (TLR); in Wiederkäuern und Schweinen wurde

auch der Rezeptor workshop cluster-1 (WC1) nachgewiesen, der ausschließlich auf einer Subpopulation von γδ-T-Zellen exprimiert wird (137, 138).

γδ-T-Zellen sind an vielen Prozessen und Reaktionen beteiligt, wie bei der Wundheilung, der Tumorüberwachung, der Antigenpräsentation und der Gewebehomöostase (133, 139, 140); außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei Infektionskrankheiten, und sie können gestresste Zellen direkt eliminieren (141). γδ-T-Zellen werden im Allgemeinen zwei wichtige Aufgaben zugeschrieben, die direkte Zytotoxizität und die Produktion von Zytokinen. Auch αβ-T-Zellen besitzen zytotoxisches Potential, jedoch können γδ-T-Zellen im Gegensatz zu diesen unabhängig von MHC-Molekülen agieren (142). Die zytotoxische Aktivität der γδ-T-Zellen wurde bereits bei Mensch (143, 144), Maus (145) und Schaf beschrieben (146). γδ-T-Zellen exprimieren verschiedene Zytokine, wodurch sie weitere Immunzellen rekrutieren können. Vor allem proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise IFN-γ, TNF-α (147) und IL-17 (148), aber auch immunsuppressive Zytokine, wie TGFβ und IL-10 (149) können von ihnen sezerniert werden.

Im Gegensatz zu αβ-T-Zellen, die nur Peptide binden können, die von den MHC-Molekülen präsentiert werden, sind γδ-T-Zellen nicht auf die Antigenpräsentation durch diese Moleküle beschränkt. Sie erkennen offensichtlich ihre Zielantigene auch direkt und haben somit die Möglichkeit, spezifische Nicht-Peptid-Liganden zu binden (37, 150). Nachdem γδ-T-Zellen nicht MHC-restringiert sind, ist ihre Antigen-Erkennung auch nicht von den Corezeptoren CD4 und CD8 abhängig. Trotzdem existieren bei allen bisher untersuchten Säugern γδ-T-Zellen, die einen CD8-Rezeptor tragen (vgl. Kap. 2.2.2.4).

Bisher sind nur wenige Liganden für γδ-T-Zellen bekannt. Die bereits identifizierten Liganden deuten jedoch darauf hin, dass γδ-T-Zellen sowohl an der angeborenen, als auch an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind (103). Humane $V\gamma9^{+}V\delta2^{+}$ T-Zellen erkennen beispielsweise Phosphoantigene (151), weshalb diese Art von γδ-T-Zellen eher dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden kann (136). $V\gamma9^{-}V\delta2^{+}$ T-Zellen reagieren hingegen nicht mit Phosphoantigenen, was auf ein adaptives Verhalten hindeutet (136). Neben den humanen $V\delta2^{+}$ T-Zellen existieren vorrangig $V\delta1^{+}$ Zellen, in geringerer Anzahl auch $V\delta3^{+}$ oder $V\delta5^{+}$ T-Zellen, welche alle eher dem adaptiven Immunsystem zugeteilt werden (152). Murine $V\gamma5^{+}$ DETC sezernieren vor allem den Keratinozytenwachstumsfaktor (keratinocyte growth factor, KGF) sowie IFN-γ und sind an der Wundheilung der Haut beteiligt (153, 154). $V\gamma7^{+}$ γδ-T-Zellen setzen überwiegend IFN-γ frei; $V\gamma1^{+}$ γδ-T-Zellen sezernieren IL-4, $V\gamma6^{+}$ und $V\gamma4^{+}$ γδ-T-Zellen IL-17 (37).

γδ-T-Zellen können außerdem Antigene erkennen, welche von nicht-klassischen MHC-Molekülen präsentiert werden, wie den murinen Stressindikatoren T10, T22 oder dem

humanen Stressindikator MICA (155). Ein weiterer bekannter Ligand der γδ-T-Zellen ist das Hitzeschockprotein 60 (HSP60) (156).

γδ-T-Zellen spielen bei der Bekämpfung verschiedenster Infektionserreger sowie bei der Tumorabwehr eine wichtige Rolle. Bei einigen Säugern ist bekannt, dass diese Zellen NK-ähnliche Rezeptoren exprimieren. Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass sie dadurch an antitumoralen Reaktionen teilnehmen (157, 158). Des Weiteren wurde durch Infektionsversuche nachgewiesen, dass γδ-T-Zellen an der Kontrolle und Beseitigung von unterschiedlichen Erregern beteiligt sind. Beispielsweise führt eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* beim Menschen zur Aktivierung und Proliferation von γδ-T-Zellen (159). Bei γδ-T-Zellen-defizienten Mäusen kommt es bei einer derartigen Infektion zu einer erhöhten Bakterienlast (160). Bei der Bekämpfung von *Salmonella enterica serovar Typhimurium* sind bei der Maus CD8-positive γδ-T-Zellen involviert (161), und auch beim Rind konnten bei einer Salmonellen-Enterocolitis aktivierte γδ-T-Zellen nachgewiesen werden (162). Darüber hinaus spielen humane $V\gamma9^{+}V\delta2^{+}$ T-Zellen bei der Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* (163) und eine Untergruppe von γδ-T-Zellen des Rindes bei der Bekämpfung von *Mycobacterium bovis* eine große Rolle (164). Neben ihrer wichtigen Funktion bei bakteriellen Infektionen sind γδ-T-Zellen zudem bedeutend für die Abwehr von viralen und parasitären Infektionen, wie beispielsweise durch *Herpes-simplex-Virus* Typ 1 (HSV-1) (165) und *Plasmodium falciparum* (166).

2.4 γδ-T-Zellen des Huhns

2.4.1 Entwicklung der γδ-T-Zellen des Huhns

Die T-Zellentwicklung beim Huhn ist der T-Zellentwicklung des Säugers sehr ähnlich, zeigt jedoch einige Besonderheiten.

Die T-Zell-Vorläuferzellen besiedeln das Thymusepithel des Hühnerembryos in drei Wellen (167, 168): Die erste beginnt am sechsten Embryonaltag (ET6), die zweite am ET12. Diese beiden Besiedlungsphasen dauern jeweils etwa ein bis zwei Tage an. Die dritte Welle startet am ET18 und setzt sich bis kurz nach dem Schlüpfen fort. Die Vorläuferzellen der ersten Welle stammen aus dem paraaortalen Bereich (169), die der zweiten und dritten Welle hingegen aus dem Knochenmark (170). Jede dieser drei Besiedlungswellen ist mit einem Peak der Vorläufer-T-Zellen im Blut korreliert (168). Ab dem ET12 beginnen die Thymozyten das Enzym TdT zu exprimieren, welches für die Addition von N-Nucleotiden während der V(D)J-Rekombination verantwortlich ist. Dieses Enzym kann dementsprechend als früher Marker für T-Zellen angesehen werden (171). Schon am ET11 exprimiert eine Subpopulation der Thymozyten den γδ-TCR-CD3-Komplex auf ihrer Oberfläche, und der Peak dieser Zellen wird mit 30% an ET15 erreicht (7). αβ-T-Zellen sind erst später nachweisbar, Vβ1 exprimierende ab ET14 (11) und Vβ2 exprimierende ab ET17 (172).

Im TCRγ-Repertoire der ersten und dritten Welle sind Vγ1-, Vγ2- und Vγ3-Gene zu gleichen Teilen vorhanden, während der γδ-TCR der T-Zellen der zweiten Welle hauptsächlich ein Vγ2-Gen trägt (173).

Wie beim Säuger entwickeln sich die αβ-T-Zellen der Hühner über ein CD4-CD8-doppelt-positives Stadium zu den finalen CD4- oder CD8-einfach-positiven αβ-T-Zellen, folglich tragen die meisten Thymozyten beide Corezeptoren, während die αβ-T-Zellen in der Peripherie nur einen davon exprimieren. Die γδ-T-Zellen hingegen exprimieren im peripheren Blut in der Regel keinen der beiden Corezeptoren (11, 172), tragen in einigen Geweben jedoch den CD8-Corezeptor (vgl. Kap. 2.2.2.4).

Die T-Lymphozyten besiedeln die sekundären lymphatischen Organe nach Verlassen des Thymus ebenfalls in Wellen (173). γδ-T-Zellen wandern als erste aus, sie sind bereits an ET15 in der Milz und im intestinalen Epithel nachweisbar. Vβ1 exprimierende αβ-T-Zellen wandern ab ET19, Vβ2 exprimierende erst zwei Tage nach dem Schlupf in die Milz ein (92).

2.4.2 Lokalisation der γδ-T-Zellen des Huhns

Bei Hühnern können γδ-T-Zellen bis zu 50% der peripheren Lymphozyten ausmachen (s. Tabelle 1). Hühner werden deshalb zu den Spezies mit einem hohen Anteil an γδ-T-Zellen gezählt (8). γδ-T-Zellen beim Huhn wurden bereits 1988 von Sowder *et al.* (7) beschrieben, sie fanden sich in verschiedenen Geweben, wobei sie bei adulten Hühnern etwa 10% der Thymozyten, 15% der zirkulierenden Lymphozyten, 25% der Milzzellen und weniger als 1% der Zellen in Bursa und Knochenmark ausmachten.

Die Verteilungen der αβ-T-Zellen und γδ-T-Zellen in peripheren Geweben unterscheiden sich erheblich (174). In der Milz befinden sich γδ-T-Zellen hauptsächlich in den sinusoidalen Bereichen, während die αβ-T-Zellen eher in den periarteriolären lymphatischen Scheiden lokalisiert sind. Auch im Darmepithel des Huhns dominieren die γδ-T-Zellen, αβ-T-Zellen sind dagegen vor allem in der Lamina propria vorhanden. Sowohl in der Milz als auch im Darm sind die meisten γδ-T-Zellen CD8-positiv, während die αβ-T-Zellen in diesen beiden Organen vorwiegend den CD4-Corezeptor tragen (11, 95). Im Gegensatz zu den bekannten DETC bei der Maus wurden beim Huhn bisher noch keine γδ-T-Zellen im epidermalen Gewebe nachgewiesen. Auch bezüglich unterschiedlicher Subpopulationen in verschiedenen Geweben kann, im Gegensatz zu Mensch und Maus, beim Huhn noch keine Aussage getroffen werden.

Es gibt Hinweise, dass sowohl Geschlechtshormone als auch das Alter der Tiere einen Einfluss auf die Frequenz der γδ-T-Zellen haben. Ältere Tiere weisen generell einen höheren Anteil dieser Zellen auf, und bei Hähnen im Alter von 4 bis 6 Monaten wurde ein Androgen-induzierter Anstieg von γδ-T-Zellen in der Milz und im peripheren Blut beobachtet (175).

2.4.3 Funktionen der γδ-T-Zellen des Huhns

Wie die γδ-T-Zellen der Säuger exprimieren auch die der Hühner verschiedene TLR (176) und werden dementsprechend nicht nur dem adaptiven, sondern auch dem angeborenen Immunsystem zugeordnet, weil sie auch zur „first line of defense“ beitragen.

Nachdem γδ-T-Zellen im Blut und in verschiedenen Geweben des Huhns sehr prominent sind, geht man davon aus, dass diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen. Allerdings ist die Funktion von γδ-T-Zellen im Huhn bisher noch nicht ausreichend charakterisiert, und auch zu den spezifischen Liganden dieser Zellen gibt es noch keine finalen Erkenntnisse. γδ-T-Zellen können aber offenbar neben der Erkennung von klassischen Peptid:MHC-Komplexen auch MHC-unabhängig agieren. Fenzl *et al.* (177) zeigten, dass γδ-T-Zellen des Huhns durch MHC-unabhängige Interaktionen aktiviert werden können.

Bei Hühnern werden wie bei Säugern den γδ-T-Zellen zwei wichtige Funktionen zugeschrieben: Die Zytotoxizität (177) und die Produktion von unterschiedlichen Zytokinen, vor allem IFN-γ und IL-10 (178-180). Es konnte außerdem durch einige Studien belegt werden, dass die Anzahl der γδ-T-Zellen im Huhn nach verschiedenen Infektionen und Vakzinationen ansteigt. γδ-T-Zellen sind offenbar beispielsweise an der Immunantwort auf MDV beteiligt. Es wurde sowohl eine erhöhte Frequenz an γδ-T-Zellen in der Milz als auch eine zytotoxische Aktivität dieser Zellen nach Immunisierung sowie nach Infektion nachgewiesen (178, 179). Diese Zellen produzieren im Falle einer Infektion vor allem IFN-γ, IL-10 (178, 181) und auch TGF-β (179). Nach einer Infektion und Immunisierung mit *Salmonella enterica serovar Typhimurium* nimmt der Anteil an CD8-positiven γδ-T-Zellen im peripheren Blut, im Intestinum und in der Milz zu (182). Eine Expansion von CD8αα-positiven γδ-T-Zellen im Blut, der Milz und dem Intestinum (vor allem im Caecum) ist auch nach einer Immunisierung gegen *Salmonella enterica serovar Enteritidis* zu beobachten (183). γδ-T-Zellen produzieren im Falle einer Infektion mit Salmonellen vor allem IFN-γ (180). Des Weiteren wurden nach einer Immunisierung gegen das *Newcastle disease virus* (NDV) aktivierte γδ-T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen (184). Hühner-γδ-T-Zellen reagieren außerdem auf *Eimeria*-Infektionen, indem vor allem im Darmepithel ihr Anteil zunimmt (185).

Außerdem ist bekannt, dass γδ-T-Zellen zwar allein nicht in der Lage sind, Graft-versus-Host-Reaktionen auszulösen, allerdings ist es möglich, dass sie eine sekundäre Rolle bei derartigen immunologischen Vorgängen spielen (186).

2.4.4 γδ-TCR-Repertoire des Haushuhns im Vergleich zum Menschen

Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bildet die Gesamtheit aller TCR, die von den T-Zellen eines Individuums gebildet werden, und kann sich während Infektionen verändern (135). In den vergangenen Jahrzehnten bediente man sich PCR-Strategien, um sich einen Überblick über das Repertoire zu verschaffen. Den Durchbruch bezüglich der TCR-Repertoire-Analysen lieferten vor einigen Jahren Methoden auf Basis des Next-Generation-Sequencing (NGS). In Kombination mit den bereits annotierten TCR-Loci verschiedener Säuger konnten Protokolle zu TCR-Repertoire-Analysen etabliert werden: beispielsweise für den Menschen (187), die Rötelmaus (188) und das Schwein (189).

Der humane TRG-Locus enthält laut ImMunoGeneTics-Informationssystem sechs funktionale Vγ-Gensegmente (TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8 und TRGV9), fünf Jγ-Gensegmente (TRGJ1, J2, JP, JP1 und JP2) und zwei konstante Genregionen (TRGC1 und TRGC2) (190). Der humane TRD-Locus setzt sich aus acht Vδ-, drei Dδ-, vier Jδ-Gensegmenten und einem Cδ-Gensegment (107) zusammen. Das TCRγ-Gen besitzt eine begrenzte Diversität und somit ist auch das Repertoire des humanen γδ-TCR eingeschränkt, γδ-T-Zellen exprimieren also

tendenziell einen invarianten TCR (135). Diese eingeschränkte Diversität kann aber durch die Nutzung der Dδ-Gensegmente und der Addition von N-Nucleotiden vervielfältigt werden. Einige Studien bezüglich des γδ-TCR-Repertoires des Menschen und der Maus machten bereits deutlich, dass die verschiedenen γδ-T-Zell-Subpopulationen gewebespezifisch sind (112, 120, 133, 135, 136), was in Kapitel 2.3.2 beschrieben wurde.

Anfang des 21. Jahrhunderts wurde auch das Hühnergenom (31) und 2023 zudem das Huxu-Hühnergenom (13) vollständig sequenziert. Bezüglich der Annotation der TCRγ- und TCRδ-Gene des Haushuhns gibt es mittlerweile beispielsweise folgende Studien.

Six *et al.* (58) beschrieben bereits 1996 den TCRγ-Locus mit drei Vγ-Familien, die jeweils 8-10 Mitglieder beinhalten, mit drei Jγ-Gensegmenten und mit einer einzelnen Cγ-Region. Auch Liu *et al.* (59) fanden drei Jγ-Gene und ein Cγ-Gen; die Vγ-Region beschrieben sie mit 37 Genen, die in 11 Untergruppen eingeteilt wurden. Die Anzahlen der Jγ- und Cγ-Gene stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen von aktuelleren Studien (12, 32, 33) überein. Bezüglich der Vγ-Familien und der Anzahl ihrer Mitglieder unterscheiden sich diese Studien jedoch untereinander und von den früheren Arbeiten. Dixon *et al.* (32) und Früh *et al.* (12) benennen vier Vγ-Familien, Zhang *et al.* (33) hingegen sechs Untergruppen der Vγ-Gensegmente. Dixon *et al.* (32) beschreiben die vier Gruppen mit je 6, 22, 7 und 5 Mitgliedern, insgesamt also 40 Segmenten, wovon 13 Pseudogene zu sein scheinen. Eine ähnliche Anzahl an Vγ-Gensegmenten fanden auch Zhang *et al.* (33), sie beschreiben 44 Segmente, wobei die sechs Gruppen jeweils 6, 19, 9, 4, 3 und 3 Mitglieder beinhalten. In einer aktuellen Studie von Früh *et al.* (12) wurde das Huxu-Hühnergenom annotiert, sie fanden in dem TCRγ-Locus vier Vγ-Familien (TRGV1-4) mit jeweils 8, 27, 10 und 8 Genen. Den TCRα/δ-Locus betreffend identifizierten 1999 Kubota *et al.* (70) eine Vδ-Familie mit ungefähr 30 Mitgliedern, zwei Dδ-, zwei Jδ-Gensegmente und ein einzelnes Cδ-Gen. Parra und Miller (191) sowie Liu *et al.* (59) bestätigten diese Anzahl der Cδ-, Dδ- und der Jδ-Segmente ebenso wie die Existenz von nur einer Vδ-Familie. Parra und Miller identifizierten in dieser Familie 36 Vδ-Gene, von denen 32 funktionell waren. Liu *et al.* fanden 31 Vδ-Gene. In der aktuellen Studie von Früh *et al.* (12) wurden deutlich mehr Vδ-Gene gefunden. Sie identifizierten fünf Vδ-Familien (TRDV1-5), die jeweils 41, 3, 1, 9 und 3, insgesamt also 57 Mitglieder enthielten, zwei TRDD Gene, zwei TRDJ Gene und ein TRDC Gen.

In den letzten Jahren wurden mehrere Analysen des TCR-Repertoires bei Hühnern durchgeführt, die neue Informationen über die Expression der verschiedenen TRG- und TRD-Familien in unterschiedlichen Geweben geliefert haben (12, 32-34).

Dixon *et al.* (32) beschäftigten sich mit dem TCRγ-Repertoire im Thymus, in der Milz und im Darm, wobei in all diesen Geweben die TRGV3-Familie dominierte. Es wurde in allen getesteten Geweben ein einzelnes Gen, TRGV3.3, als das häufigste Gen beschrieben. Es nahm

30-40% des gesamten Vγ-Repertoires ein und wies hochdiverse private CDR3-Sequenzen auf. Private Sequenzen sind für jedes Individuum einzigartig, sie dominierten in dieser Studie in den meisten TRGV-Genen mit 80-100%. Dementsprechend machten öffentliche Gene, die sich verschiedene Individuen teilen, einen geringeren Anteil aus.

Zhang *et al.* (33) bestimmten das TCRγ-Repertoire im Thymus. Die vier untersuchten Tiere exprimierten mehrere Gene aus verschiedenen Familien, die vier häufigsten Gene waren Vγ3.7, Vγ2.13, Vγ1.6 und Vγ1.3. Dabei dominierte die Vγ3-Familie im Thymus mit 43,98%, und das häufigste Gen Vγ3.7 nahm 20,58% des Vγ-Repertoires ein.

Früh *et al.* (12) untersuchten das TCRγ-Repertoire in der Milz. Hierbei fielen drei sehr häufig vorkommende Vγ-Gene auf, TRGV2-26, TRGV3-5 und TRGV3-6. Als dominierendes Vδ-Gen wurde TRDV1-25 beschrieben. Die häufigsten Jγ- und Jδ-Gene in der Milz waren in dieser Studie TRGJ3 und TRDJ1.

Linti *et al.* (34) verglichen das TCRγ-Repertoire von unstimulierten Milzzellen mit IL-2 und IL-12 stimulierten Milzzellen. Wie bei Früh *et al.* (12) wurden TRGJ3 und TRDJ1 als die häufigsten Jγ- und Jδ-Gene identifiziert. Auch die vorherrschenden Vγ-Gene, die in den unstimulierten Milzzellen genutzt wurden, deckten sich mit denen, die von Früh *et al.* (12) in der Milz beschrieben worden sind. Als dominierendes Vδ-Gen wurde TRDV1-2 benannt. In den proliferierenden γδ-T-Zellen änderte sich sowohl das TCRγ- als auch das TCRδ-Repertoire. Es überwog nur noch ein Vγ-Gen, nämlich TRGV3-5. Bei den Vδ-Genen hingegen fand sich bei jedem Tier ein anderes dominierendes Gen.

2.5 Monoklonale Antikörper gegen T-Zellen

2.5.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper haben eine Affinität und Spezifität gegenüber einem bestimmten Epitop eines ausgewählten Antigens und stammen von einem einzelnen B-Zell-Klon (192). Sie sind für die Immunologie-Forschung unabdingbar und finden auch in der Klinik Anwendung. Mithilfe dieser Antikörper können bestimmte Immunzellen hervorgehoben, aber auch Pathogene detektiert und gegebenfalls bekämpft werden (193). Zudem finden sie mittlerweile in der Krebstherapie Anwendung (194).

Monoklonale Antikörper (mAk) können technisch durch die Kultivierung sogenannter Hybridome produziert werden. Hybridome sind Hybrid-Zellen, bestehend aus malignen Myelom-Zellen und bestimmten B-Lymphozyten, die nur eine bestimmte Art von Antikörpern synthetisieren. Die Hybridom-Technik wurde erstmals 1975 von Köhler und Milstein (195, 196) beschrieben; 1984 erhielten sie gemeinsam mit Niels Jerne für die Entwicklung dieser Technik den „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“. Inzwischen gibt es einige Publikationen, die sich mit der Hybridom-Technik beschäftigen und Modifikationen des ursprünglichen Protokolls beschreiben (197-199). Kurz zusammengefasst wird für die Herstellung muriner Hybridome primär eine Maus mit einem bestimmten Antigen immunisiert, woraufhin die B-Lymphozyten beginnen, Antikörper gegen dieses Antigen zu produzieren. Die aus der Milz gewonnenen B-Lymphozyten werden dann mit malignen Myelom-Zellen fusioniert und in einem geeigneten Medium selektiert. Daraus resultiert eine stabile Zelllinie, die Charakteristika beider Zellarten aufweist: Die Krebszellen verleihen ihr Langlebigkeit und stetiges Proliferieren *in vitro*, während die B-Lymphozyten einen spezifischen Antikörper sezernieren, der nur das gewünschte Antigen erkennt. Zhang (198) veröffentlichte ein ausführliches Protokoll zur Handhabung von Hybridomen. Die Hybridom-Technik ermöglicht heutzutage eine bequeme, kostengünstige und nahezu unbegrenzte Produktion von mAk (200).

Wie bereits erwähnt, finden mAk in der Immunologie-Forschung vor allem deshalb Anwendung, weil man mit ihrer Hilfe bestimmte Immunzellen im Körper ansprechen („markieren“) und deren Verteilung in unterschiedlichen Geweben untersuchen kann. So existieren neben anderen Immunzell-Markern verschiedene T-Zell-Marker für unterschiedliche Spezies, von denen in Tabelle 2 eine Auswahl aufgeführt ist.

Spezies	Antigen	Klon	Referenz
Mensch	CD3	UCHT1	Beverley und Callard (201)
		OKT1	Kung *et al.* (202) Reinherz und Schlossman (203)
		OKT3	Kung *et al.* (202) Reinherz und Schlossman (203)
		CD3-12	Jones *et al.* (204) Mitra *et al.* (205)
	TCR αβ	beta F1	Brenner *et al.* (206)
	TCR γδ	5A6.E9	Band *et al.* (207)
	TCR γδ (Vδ1)	A13	Ferrini *et al.* (208) Miossec *et al.* (209)
	TCR γδ (Vδ2)	anti-TiVδ2	Miossec *et al.* (209)
	TCR γδ (Vγ9)	anti-TiγA	Jitsukawa *et al.* (210)
	CD4	OKT4	Reinherz und Schlossman (203) Reinherz *et al.* (211)
	CD8	OKT8	Reinherz und Schlossman (203)
Maus	CD3	145-2C11	Leo *et al.* (212)
	TCR αβ	H57-597	Kubo *et al.* (213)
	TCR γδ	UC7-13D5	Houlden *et al.* (214)
	TCR γδ (Vγ5)	536	Havran *et al.* (215)
	TCR γδ (Vγ6)	1C10-1F7	Hatano *et al.* (216)
	CD4	GK1.5	Dialynas *et al.* (217)
	CD8	53-6.7	Ledbetter und Herzenberg (218)
Schwein	CD3	PPT3	Kirkham *et al.* (219)
		PC3.88A	Yang *et al.* (220)
	CD4	74-12-4	Pescovitz *et al.* (221)
	CD8α	76-2-11	Pescovitz *et al.* (221)
	CD8β	11/295/33	Jonijć und Koszinowski (222) Lunney (223)
		11/122/28	Jonijć und Koszinowski (222) Lunney (223)
Huhn	CD3	CT-3	Chen *et al.* (81)
	TCR αβ (Vβ1)	TCR2	Chen *et al.* (11)
	TCR αβ (Vβ2)	TCR3	Chen *et al.* (224)
	TCR γδ	TCR1	Sowder *et al.* (7) Chen *et al.* (11)
	CD4	CT-4	Chan *et al.* (90)
	CD8α	CT-8	Chan *et al.* (90)
	CD8β	EP42	Chan *et al.* (90) Tregaskes *et al.* (97)

Tabelle 2: Auswahl an T-Zell-Markern verschiedener Spezies

2.5.2 T-Zell Marker des Säugers

Humane T-Lymphozyten-Marker, die einen extrazellulären Teil des CD3 Moleküls erkennen, sind die Klone UCHT1 (201), OKT1 und OKT3 (202, 203) sowie der Klon CD3-12 (204), der ein kommerziell erhältlicher anti-human CD3ε-Marker ist. Letzterer zeigte bei intrazellulären Färbungen Kreuzreaktionen mit dem Hühner-CD3 und kann somit auch bei Hühnerzellen angewendet werden (205). Ein muriner Marker für CD3 ist der Klon 145-2C11 (212). αβ-T-Zellen lassen sich bei Mäusen mit dem Klon H57-597 (213) identifizieren und beim Menschen mit dem Klon beta F1, der allerdings kein Oberflächenmolekül erkennt, sondern nur die Plasmamembran-Form des TCR (206). Die humanen γδ-T-Zellen werden beispielsweise von dem Klon 5A6.E9 (207) erkannt und lassen sich weiter unterteilen in Vδ1- und Vδ2-spezifische γδ-T-Zellen, für die es bereits Marker gibt. Für Vδ1-spezifische T-Zellen gibt es zum Beispiel den Klon A13 (208, 209) und für Vδ2-spezifische T-Zellen den Klon anti-TiVδ2 (209). Zusätzlich existiert ein mAk für die Vγ9-spezifischen γδ-T-Zellen (Klon anti-TiγA) (210). Alle murinen γδ-T-Zellen werden vom Klon UC7-13D5 erkannt (214), während es auch spezifische mAk gegen beispielsweise $V\gamma5^+$ (Klon 536) (215) oder $V\gamma6^+$ (Klon 1C10-1F7) (216) γδ-T-Zellen gibt. Für T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen existieren Marker für Mensch und Maus. Das humane CD4-Molekül wird vom Klon OKT4 (203, 211) und das CD8α-Molekül vom Klon OKT8 (203) erkannt. Murine T-Helferzellen können vom Klon GK1.5 (217) und zytotoxische T-Zellen vom Klon 53-6.7 (218) identifiziert werden.

Auch für Schweine gibt es einige T-Zellmarker, wie beispielsweise den anti-CD3 mAk PPT3 (219) oder PC3.88A (220). Für T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen wurden ebenfalls schon mAk entwickelt, beispielsweise der Klon 74-12-4 gegen das CD4-Epitop (221), der Klon 76-2-11 gegen das CD8α-Epitop (221), sowie zwei anti-CD8β mAk, die Klone 11/295/33 und 11/122/28 (222, 223).

2.5.3 T-Zell Marker des Huhns

Wie auch beim Säuger exprimieren alle T-Lymphozyten des Huhns, die den Thymus verlassen haben, den T-Zellmarker CD3. Es existiert bereits ein kommerziell erhältlicher mAk gegen das Hühner-CD3, der Klon CT-3 (81). Wie zuvor beschrieben, lassen sich T-Zellen anhand ihres TCR weiter in αβ- und γδ-T-Zellen einteilen. Der mAk TCR1 stellt einen Marker für γδ-T-Zellen dar (7, 11), er bindet an den γδ-TCR und erkennt dementsprechend alle γδ-T-Zellen. Welches Epitop er genau innerhalb des γδ-TCR erkennt, ist bisher allerdings noch nicht geklärt. Während es bei Hühnern noch keine weiteren mAk gegen γδ-T-Zellen gibt, lassen sich αβ-T-Zellen bereits anhand der variablen Regionen der β-Kette mithilfe der Klone TCR2 (11) und TCR3 (224) in Vβ1- bzw. Vβ2-spezifische αβ-T-Zellen unterteilen. Auch die CD4- und

CD8-Corezeptoren wurden im Huhn identifiziert (90) und mAk gegen diese generiert. So existiert neben anderen der Klon CT-4 gegen CD4, CT-8 gegen CD8α sowie ein mAk (Klon EP42) gegen CD8β (90, 97).

3. ZIELSETZUNG

Hühner zählen zu den Spezies mit einem hohen Anteil an γδ-T-Zellen in verschiedenen Geweben. Trotzdem ist bisher wenig über diese Zellen bekannt, was unter anderem daran liegt, dass es bisher nur einen spezifischen Marker (Klon TCR1) für diese Zellgruppe gibt und keinerlei Marker für γδ-T-Zell-Untergruppen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue mAk gegen γδ-T-Zell-Oberflächenantigene zu charakterisieren, um γδ-T-Zellen insgesamt besser zu verstehen und um verschiedene Untergruppen der γδ-T-Zellen von Hühnern unterscheiden zu können.

Hierfür sollte zunächst ein Durchflusszytometrie-Screening mit zuvor in unserem Labor generierten mAk (225) auf einer γδ-T-Zelllinie durchgeführt werden, um potentielle γδ-T-Zell-Marker zu identifizieren. Durchflusszytometrische Färbungen auf unterschiedlichen Vγ-Zelllinien und Geweben, wie Milzleukozyten, peripheren Blutlymphozyten (peripheral blood lymphocytes; PBL) und intraepithelialen Lymphozyten (intraepithelial lymphocytes; IEL) des Ileums können bereits einige Informationen über die Liganden der neuen mAk liefern.

Ob die Liganden der neuen mAk und der Ligand des bereits etablierten TCR1 koexprimiert werden, lässt sich durch Doppelfärbungen untersuchen. Durch Sort-Experimente und TCR-Repertoire-Analysen sollte abschließend herausgefunden werden, ob, und wenn ja, welche γδ-T-Zell-Subpopulationen durch einen neuen mAk erkannt werden.

Die Charakterisierung neuer mAk, welche bestimmte Subpopulationen von γδ-T-Zellen erkennen, kann dazu dienen, die Verteilung dieser spezifischen γδ-T-Zellen in verschiedenen Organen und zudem die Veränderungen dieser Subpopulationen während Infektionen zu untersuchen.

4. PUBLIKATION

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2024 mit der Publikation „Characterization of a novel chicken γδ TCR-specific marker“ in dem Journal „Developmental and Comparative Immunology“ veröffentlicht (DOI: 10.1016/j.dci.2024.105250) und mit Genehmigung des Journals im Rahmen der Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0) in diese Arbeit integriert.

Developmental and Comparative Immunology 161 (2024) 105250

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/devcompimm

Characterization of a novel chicken γδ TCR-specific marker

Veronika E.M. Drexel [a], Thomas W. Göbel [a,*], Simon P. Früh [a,b]

[a] Department of Veterinary Immunology, LMU Munich, Lena-Christ-Straße 48, 82152 Planegg-Martinsried, Germany
[b] Department of Veterinary Medicine, Institute of Virology, FU Berlin, Robert-von-Ostertag-Straße 7, 14163 Berlin, Germany

A B S T R A C T

Chickens are a species with a high number of γδ T cells in various tissues. Despite their abundance, γδ T cells are poorly characterized in chickens, partially due to a lack of specific reagents to characterize these cells. Up until now, the TCR1 clone has been the only γδ T cell-specific monoclonal antibody (mAb) in chickens and additional reagents for γδ T cell subsets are needed. In order to address this issue, new mAb were generated in our laboratory by immunizing mice with *in vitro* cultured γδ T cells. In an initial flow cytometric screen a new mAb, clone "8D2", displayed an interesting staining pattern that mirrored γδ TCR up- and down-regulation in the γδ T cell line D4 over time, prompting us to characterize this antibody further. We compared the expression of the unknown 8D2 epitope in combination with TCR1 staining across various primary cells. In splenocytes, peripheral blood lymphocytes and intestinal epithelial cells, 8D2 consistently labeled a subset of TCR1$^+$ cells. To determine, whether specific γδ T cell receptors were recognized by 8D2, we sorted γδ T cells according to their 8D2 and TCR1 expression and analyzed their TCR V(D)J gene usage by TCR profiling. Strikingly, sorted 8D2$^+$ cells preferentially expressed Vγ3 genes, whereas the TCR Vγ genes used by TCR1$^+$ 8D2$^-$ cells were more variable. γδ TCR in 8D2$^+$ cells were most frequently comprised of gamma chain VJ genes TRGV3-8 and TRGJ3, and delta chain VDJ genes TRDV1-2, TRDD2, TRDJ1. To confirm binding of 8D2 to specific γδ TCR, the preferentially utilized combination of TRG and TRD was expressed in HEK293 cells in combination with CD3, demonstrating surface binding of the 8D2 mAb to this Vγ3 γδ TCR-expressing cell line. Conversely, HEK293 cells expressing either Vγ1 or Vγ2 TCR did not react with 8D2. In conclusion, 8D2 is a novel tool for identifying specific Vγ3 bearing γδ T cells.

1. Introduction

T lymphocytes are an essential part of the adaptive immune system in both mammals and birds. They can be divided into αβ T cells and γδ T cells based on the expression of the heterodimeric membrane-bound T cell receptor (TCR) that is comprised of either an alpha (TCRα) and a beta (TCRβ) chain, or a gamma (TCRγ) and a delta (TCRδ) chain, respectively (Davis and Bjorkman, 1988; Chen et al., 1996). Each TCR chain consists of a constant and a variable region, with the highly diverse variable regions mainly formed by somatic DNA recombination of the V (variable), D (diversity; only for TCRβ and TCRδ) and J (joining) genes in combination with additional mechanisms that further increase junctional and combinatorial diversity (Tonegawa, 1983; Schatz and Swanson, 2011). In chickens, the TCRγ VJ genes are located on chromosome 2 (Six et al., 1996; Liu et al., 2020) and the TCRβ cluster of VDJ genes on chromosome 1 (Liu et al., 2020; Zhang et al., 2020). The TCRα/δ V(D)J genes form a hybrid cluster on chromosome 27, with the TCRδ genes located between the V and J genes of the alpha chain. In this locus, gene rearrangement can occur between Vα and Dδ and Jδ genes, leading to increased combinatorial diversity (Göbel et al., 1994; Kubota et al., 1999; Liu et al., 2020). Furthermore, in chickens, a second TCRδ locus was identified on chromosome 10 that only consists of a single set of VDJC genes (Parra et al., 2012).

The tissue distribution and phenotypes of various T cell subsets have been well characterized in humans and mice (Kumar et al., 2018). Additionally, there is considerable knowledge about chicken T cells (Chen et al., 1994). The number of γδ T cells varies significantly between different species. While human, mouse and rat are among the species with comparatively few γδ T cells in the peripheral blood (Hayday, 2000; Shekhar et al., 2012), chickens (Sowder et al., 1988), along with goats (Caro et al., 1998), cattle, sheep (Mackay and Hein, 1989; McClure et al., 1989) and pigs (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008), are classified as γδ high species, characterized by a γδ T cell frequency of more than 10% in peripheral blood. In chickens, the frequency of γδ T cells can reach up to 50% of all T cells in the peripheral blood (Cihak et al., 1993). Both age and sex appear to have an impact on the frequency of γδ T cells in chickens. For example, an androgen-induced increase in the number of γδ T cells in the peripheral blood was observed in male chickens between 3 and 6 months of age (Arstila and Lassila, 1993). The distribution of T cell subsets in peripheral tissues also varies in chickens. While αβ T cells predominantly occur in the splenic periarteriolar sheath and the lamina propria of the intestine, γδ T cells are primarily located in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium (Bucy et al., 1988).

The antigen-discriminating function of αβ T cells is mediated by the

* Corresponding author.
E-mail address: goebel@lmu.de (T.W. Göbel).

https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105250
Received 19 July 2024; Received in revised form 16 August 2024; Accepted 16 August 2024
Available online 17 August 2024
0145-305X/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

TCR, which specifically recognizes cognate peptide bound to MHC molecules on antigen-presenting cells. While $CD4^+$ T helper αβ T cells bind peptides presented on MHC class II molecules, $CD8^+$ cytotoxic αβ T cells recognize peptide-MHC class I complexes. Both CD4 and CD8 coreceptors also exist in chickens (Chan et al., 1988) and they seem to be very similar to their mammalian counterparts (Chen et al., 1990; Cooper et al., 1991).

Compared to αβ T cells, the function of γδ T cells is less well characterized. γδ T cells have characteristics of innate and adaptive immune cells, therefore they likely contribute to both responses (Chien et al., 2014). In contrast to αβ T cells, γδ T cells are not restricted to antigens presented on MHC molecules. Instead, they often recognize specific non-peptide molecules. Human Vγ9Vδ2 T cells, for example, recognize phosphoantigens (Holoshitz et al., 1993; Constant et al., 1994; Tanaka et al., 1995; Sireci et al., 2001), but overall few γδ T cell ligands have been identified. In chickens, there is evidence that γδ T cells exhibit cytotoxic activity in an MHC-independent manner (Fenzl et al., 2017). γδ T cells also contributed to the immune responses against Marek's disease virus (MDV) by producing cytokines such as IFN-γ, IL-2, and IL-17, and exhibiting cytotoxic activity (Laursen et al., 2018; Matsuyama-Kato et al., 2022, 2023). In chickens infected with *Salmonella typhimurium* an expansion of CD8αα-positive γδ T cell subsets in different organs was observed (Berndt et al., 2006). In addition, the frequency of γδ T cells was increased in the peripheral blood after immunization against *Salmonella* (Berndt et al., 2006; Braukmann et al., 2015). Likewise, activated γδ T cells were detected in the peripheral blood of chickens immunized against Newcastle disease virus (NDV) (Dalgaard et al., 2010; Andersen et al., 2017). A large proportion of chicken splenic γδ T cells express CD8, while only a few γδ T cells in the blood are $CD8^+$ (Chen et al., 1988; Kasahara et al., 1993). CD8-expressing γδ T cells, similar to those found in chickens, have also been identified in various mammalian tissues. Approximately 50% of γδ T cells in the human spleen express CD8 on their surface, with up to 30% of γδ T cells in human blood also exhibiting CD8 expression (Bucy et al., 1989). Similarly, porcine γδ T cells are classified into $CD8^+$ and $CD8^-$ cells (Kim et al., 2021). Furthermore, $CD8^+$ γδ T cells have been detected in the murine intestinal epithelium (Goodman and Lefrançois, 1988).

In chickens, only few antibodies exist against cell surface antigens that are exclusively expressed on T cells. As in mammals, CD3 is found on all T cells (Chen et al., 1986), since it is mandatory for the surface expression of the TCR. In addition, three monoclonal antibodies (mAb) specific for the chicken TCR have been generated until now: Clone TCR1 is a specific marker for γδ T cells (Sowder et al., 1988) and clones TCR2 and TCR3 for αβ T cells (Chen et al., 1988, 1989; Cihak et al., 1988), with TCR2 specifically recognizing Vβ1 family TCR and TCR3 recognizing Vβ2 family TCR (Lahti et al., 1991; Chen et al., 1996).

The different subtypes and functions of γδ T cells in chickens and other species are poorly understood, and new tools to better characterize these cells are needed. Next-Generation Sequencing of T cell receptors has recently been adapted to chickens, allowing to characterize the clonal distribution of T cells in various tissues (Dixon et al., 2021; Zhang et al., 2021; Früh et al., 2024; Linti et al., 2024). Annotation of expressed TCR is based on the germline V(D)J genes. Our group recently published an updated annotation of the chicken TCR loci (Früh et al., 2024): The TCR γ locus contains 4 TRGV families (TRGV1-4) comprising 8, 27, 10 and 8 members, respectively. This locus also includes 3 TRGJ genes and 1 TRGC gene. The TCR δ locus contains 5 TRDV families (TRDV1-5) comprising 41, 3, 1, 9 and 3 genes, respectively, and 2 TRDD genes, 2 TRDJ genes and 1 TRDC gene.

In recent years, several chicken T cell receptor repertoire analyses have been performed and revealed new information about the expression of the different TRG and TRD families in various tissues (Six et al., 1996; Parra and Miller, 2012; Liu et al., 2020; Dixon et al., 2021; Zhang et al., 2021; Huang et al., 2023; Früh et al., 2024). A characteristic distribution of V(D)J gene usage was found for all chains, yet a tissue-specific expression bias of specific Vγ genes was not observed in chickens. This was in sharp contrast to human tissues, where distinct biases for specific γδ T cells were described in various tissues. In human peripheral blood, for example, the majority of γδ T cells expressed $Vγ9Vδ2^+$, while in solid organs and mucosal tissues non-$Vγ9Vδ2^+$ TCR were more frequently expressed (Fichtner et al., 2020). In the epidermis of mice $Vγ5^+$-expressing T cells were predominant, while $Vγ7^+$ T cells were primarily located in the intestinal epithelium and $Vγ1^+$ T cells were circulating in the periphery (Fichtner et al., 2020). While TCR repertoire sequencing is a powerful tool to study T cells, it does not enable the analysis of the spatial distribution of γδ T cells in tissues or the isolation of live cells based on TCR expression. The goal of this study was to develop new antibodies for specific γδ T cell subsets.

To our knowledge up until now there were no mAb available that could discriminate chicken gamma delta T cells based on the expression of specific Vγ or Vδ families. Here we describe a novel mAb, designated 8D2, that specifically recognizes a γδ T cell subset. We provide evidence that this mAb is specific for Vγ3-expressing γδ TCR. This novel mAb will be an important tool to further characterize chicken γδ T cell subsets.

2. Materials & methods

2.1. Animals and ethics statement

Chicken line M11 (B^2/B^2) was supplied by S. Weigend (Federal Research Institute for Animal Health, Mariensee, Germany). Fertilized eggs either from S. Weigend or from our own breeding were incubated, hatched and kept under conventional conditions at the Institute for Animal Physiology, University of Munich. The chickens had unrestricted access to food and water. Organs required for the experiments were taken from male and female chickens between 3 and 8 months of age. The animal experiments were authorized by the committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Government of Upper Bavaria, Germany (55.2-1-54-2532.0-60-2015; June 2019).

2.2. Cell culture and cell preparation

The chicken γδ T cell line D4 was cultured in RPMI 1640 cell culture medium containing 8% fetal bovine serum (FBS) and 2% chicken serum (ChS) in an incubator with 5% CO_2 at 40 °C. This cell line was generated in our laboratory by retroviral transformation of primary γδ T cells as described before (Marmor et al., 1993) and expressed a TCR comprised of the following genes: TRGV3-5, TRGJ3, TRDV1-4 and TRDJ3. To obtain a single cell suspension of splenocytes, the whole organ was passed through a stainless-steel mesh followed by density gradient centrifugation using Ficoll Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich GmbH). Slow-speed centrifugation of blood was performed to obtain peripheral blood lymphocytes (PBL) (Viertlboeck and Göbel, 2007). Briefly, heparinized blood was mixed 1:1 with PBS and centrifuged at 60×*g* for 15 min at room temperature. After centrifugation the buffy coat was collected with a Pasteur pipette. Intraepithelial lymphocytes (IEL) were isolated from the ileum as described before (Göbel, 2000) with minor modifications. Briefly, the intestinal lumen was rinsed with PBS several times using a syringe, filled with PBS containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1 mM dithiothreitol (DTT), then the lumen was closed with yarn and the tissue was incubated in prewarmed PBS for 30 min at 37 °C. After incubation the intraluminal PBS containing IEL was removed and washed with additional PBS. IEL were further separated by density gradient centrifugation using Ficoll Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich GmbH).

2.3. Antibodies for flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting

Single-cell suspensions were incubated with antibodies diluted in PBS with 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide for 20 min on ice in the dark. After each incubation, the cells were washed with 200 μl PBS containing 0.1% BSA and 0.01% sodium azide prior to

analysis. Live and dead cells were discriminated with the Fixable Viability Dye eFluor™ 506 or 780 (Invitrogen). Indirect single-color flow cytometry staining was performed by using 8D2 mAb (unlabeled, mouse IgG1) or anti-TCRγδ mAb (unlabeled, clone TCR1, mouse IgG1, SBA), followed by incubation with goat-anti-mouse IgG1-APC (SBA). 8D2 was generated in our laboratory by immunizing mice with splenocytes stimulated with IL-2 and IL-12 and generation of hybridomas (Huhle et al., 2017). For multicolor flow cytometry staining, cells were first incubated with 8D2, then labeled with goat-anti-mouse IgG1-APC conjugate, followed by blocking with normal mouse serum (Jackson, JIM-015-000-120) for 20 min on ice in the dark, and a final staining with directly conjugated monoclonal antibodies obtained from Southern Biotechnology Associates (SBA): anti-TCRγδ (conjugated with FITC or PE, clone TCR1, mouse IgG1) and anti-CD3 (conjugated with Pacific blue, clone CT3, mouse IgG1). Anti-CD8 (unlabeled, clone CT8, mouse IgG1) was obtained from SBA and labeled with a PerCPCy5.5 Conjugation Kit (Biorad) in our laboratory following the manufacturer's instructions. IEL were additionally stained with anti-CD45 (unlabeled, clone 16-6, mouse IgG2a) (Viertlboeck and Göbel, 2007) and goat-anti-mouse IgG2a-FITC (SBA) as a secondary antibody. The measurements were conducted using a FACS Canto II (BD) and Fluorescence-activated cell sorting was performed on a FACSAria III instrument (BD) with an 80 μm nozzle. The purity of the sort-purified cells was higher than 96%. FlowJo v10.9.0 Software (Becton, Dickinson and Company, 2023) was utilized for data analysis. The gating strategy and an overview of all staining reagents is provided in the supplementary material (Supplementary Fig. 1, Supplementary Table 1).

2.4. RNA isolation, cDNA synthesis and semi-nested PCRs

The samples were prepared for Next-Generation Sequencing (NGS), performed by Eurofins Genomics (Ebersberg), as described before (Mamedov et al., 2013; Migalska et al., 2018; Linti et al., 2024). Briefly, total RNA was extracted from sort-purified cells (Relia Prep Cell RNA Cell Miniprep System, Promega) using 4.5×10^6 of each $TCR1^+8D2^-$ and $TCR1^+8D2^+$ cells and 5×10^5 of $TCR1^-8D2^+$ cells. Quantity and quality of the isolated RNA were checked using a Bioanalyzer 2100 Expert and a NanoDrop ND-1000. Only samples with RIN values above 7.7 and 260/280 and 260/230 ratios greater than 1.99 were used. cDNA was synthesized with a SMARTScribe Reverse Transcriptase (Takara) using 50 ng RNA, reverse primers specific for gamma and delta C-regions and a Template Switch Oligonucleotide containing a Unique Molecular Identifier (UMI) (Linti et al., 2024). γδ TCR were further amplified in two semi-nested PCR using the Advantage2 Polymerase from Takara and gene-specific reverse primers (Linti et al., 2024). Amplicons were sequenced by Illumina sequencing at 2 × 300 bp and a read depth of 30817–73557 reads per amplicon.

2.5. Bioinformatic analysis

Bioinformatic analysis was performed as previously described (Früh et al., 2024). FASTQ files were received from Eurofins. Quality control was performed with FastQC 0.12.0 (Andrew, 2010) and the alignment and gene annotation with MiXCR 4.2.0 (Bolotin et al., 2015). Finally, the graphical representations were generated in R v4.3.3 with Immunarch 0.9.1 (Nazarov et al., 2023).

2.6. Stable transfection

To establish a stable HEK293 cell line expressing chicken CD3 and a specific chicken TCR, the pSBbi-GP vector (Kowarz et al., 2015) was used. In a first step the EGFP gene in the vector was exchanged with the chicken CD3γ/δ (NCBI accession number: M59925), CD3ε (NCBI accession number: Y08918) and CD3ζ (NCBI accession number: AJ002317) genes separated by 2a ribosome skipping elements. Next a synthetic gene containing Vγ3-8, Jγ3 and Vδ1-2, Dδ2, Jδ1 (Geneart) was introduced into the cloning site of the vector under the control of an EF1a promotor. Following sequencing of the entire plasmid to check sequence integrity, it was transfected into HEK293 cells using Metafectene Pro (Biontex). After 24 h of incubation at 37 °C with 5% CO_2, the transfected cells were selected with Puromycin at a concentration of 1 mg/ml. To confirm successful transfection, flow cytometry analysis with the CT3 mAb was performed. A graphical representation of the plasmid was created in SnapGene 5.2.4 (GSL Biotech LLC, Dotmatics) (Supplementary Fig. 2).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using R software (v4.4.1). A negative binomial generalized linear model (GLM) was fitted, with counts of T cell receptor sequences as the response variable and the cell population as predictor. This analysis was performed using the glm.nb() function from the MASS package (v7.3-61) (Venables and Ripley, 2002). For post-hoc pairwise comparisons among levels of the predictors, the emmeans package (v1.10.3) was employed, applying Tukey adjustment for multiple comparisons (Lenth et al., 2024). Values with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. To assess the linear relationship between 8D2 mAb and either TCR1 or CD3 mAb the Pearson correlation coefficients were calculated with Microsoft Excel.

3. Results and discussion

Our goal was to develop new markers against γδ T cell surface antigens that could be used to further characterize γδ T cells in chickens. We initially produced new mAb by creating hybridomas from mice that were immunized with *in vitro* expanded and highly activated γδ T cells. From this experiment we obtained several interesting candidate mAb that stained γδ T cells by flow cytometry surface staining.

3.1. The staining pattern of the 8D2 mAb reveals specificity for the γδ TCR

We tested these mAb initially on the γδ T cell line D4. The TCR surface expression on this cell line varied over time in cell culture as determined by staining with anti-TCRγδ clone TCR1. This phenomenon is known from retrovirally transformed cells and is due to genomic instability. Interestingly, when staining of the new candidate mAb clone 8D2 was compared with that of TCR1, we observed that the frequencies of positive cells at different time points were very similar between both mAb. At 14 days 58.8% of the cells were $TCR1^+$, while 58.6% of the cells were $8D2^+$. After 21 days in culture the amount of the positive cells for both mAb was about 47% (Fig. 1). Double staining of the cell line with TCR1 and 8D2 mAb showed that the same cells were positive for both mAb (Supplementary Fig. 3).

To determine whether 8D2 staining also mirrored TCR1 staining in primary cells, we stained leukocytes isolated from spleen, blood and intestine with 8D2 and TCR1 in combination with additional γδ T cell markers anti-CD3 clone CT3 and anti-CD8 clone CT8 mAb (Fig. 2, Supplementary Fig. 4). Surprisingly, in contrast to the staining of D4 cells, the staining pattern of 8D2 was distinct from that of TCR1 on primary cells. While 8D2 predominantly stained $TCR1^+$ γδ T cells, it only bound to a fraction of $CD3^+$ $TCR1^+$ γδ T cells. Overall, only few $8D2^+$ cells were not bound by TCR1 (Fig. 2, left panel). The frequency of $8D2^+$ cells was highest in the spleen when compared to PBL and IEL, as was the percentage of $8D2^+CD8^+$ double positive cells. Only a small percentage of PBL and IEL expressed 8D2 with variable CD8 co-expression (Fig. 2, right panel).

Since γδ T cell frequencies generally vary significantly between individual chickens, we next determined whether the observed pattern was consistent across animals. Splenocytes, PBL and IEL from four different individual chickens were stained with a combination of TCR1

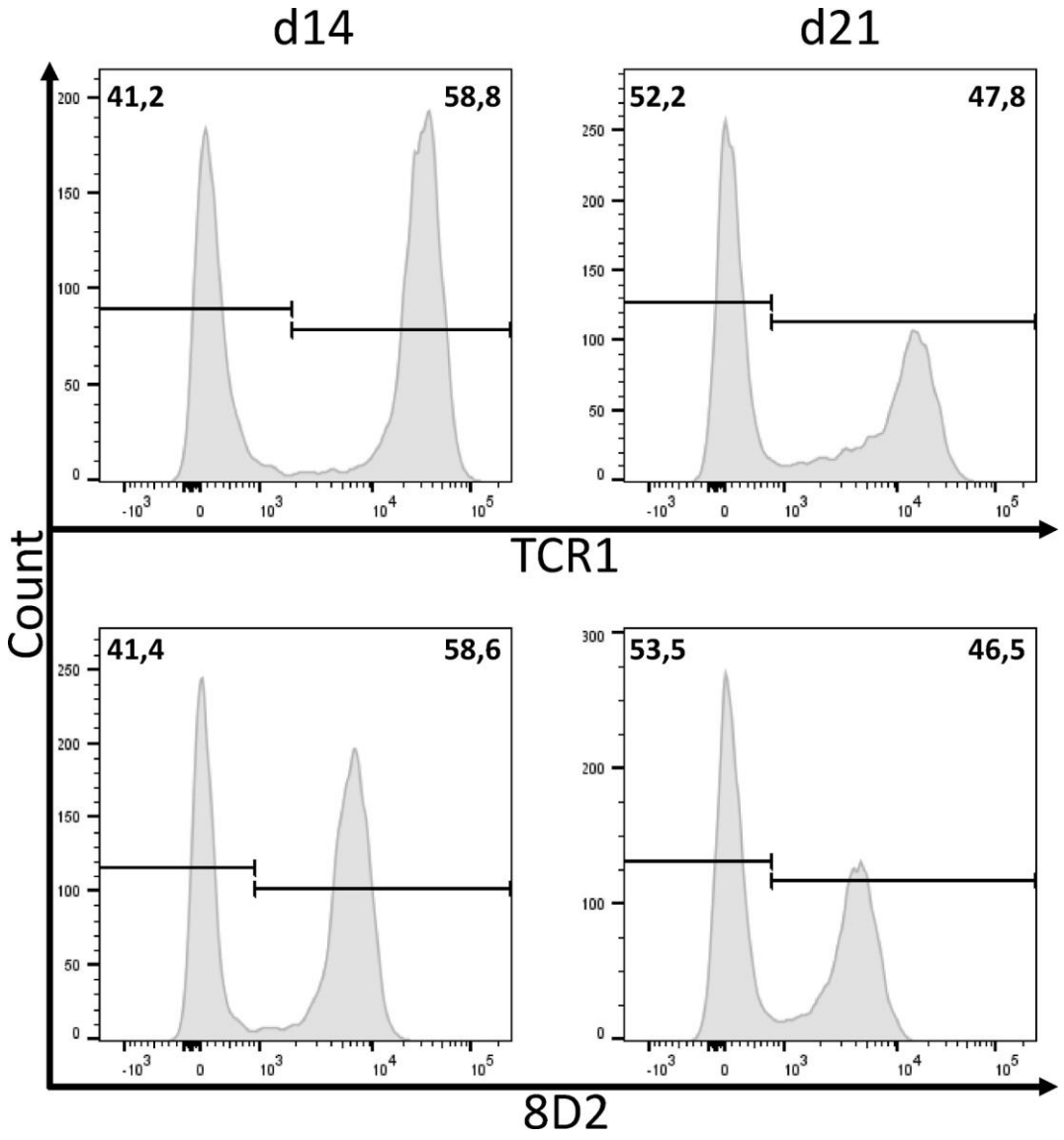


Fig. 1. Flow cytometry analysis of the γδ T cell line D4 reveals comparable reactivity with the 8D2 and TCR1 mAb.
Flow cytometry analysis of the γδ T cell line D4 stained with TCR1 (upper panel) and 8D2 mAb (lower panel) after 14 (left panel; d14) and 21 days (right panel; d21) in culture. Live single cells are shown with the percentage of cells indicated. Representative staining of n = 3 replicates.

and 8D2 mAb (Fig. 3). As expected, γδ T cell frequencies, as determined by TCR1 binding in these tissues, varied between 10% (animal 3, blood; Fig. 3) and 50% (animal 4, IEL; Fig. 3) of single live cells in splenocytes and PBL, and of CD45$^+$ single live cells in IEL. The frequency of 8D2$^+$ cells was consistently lower and ranged from ~2-3% (all animals, blood; Fig. 3) to 38% (animal 4, IEL; Fig. 3). The expression of the 8D2 epitope and the γδ TCR was positively correlated in all tissues where animals that had higher frequencies of TCR1$^+$ γδ T cells generally also exhibited increased frequencies of 8D2$^+$ cells, and vice versa (Fig. 3).

Together, these data indicated that both the TCR1 and 8D2 mAb may react with a cell surface molecule on the D4 cells that is either identical or co-regulated. Double staining of this Vγ3-type TCR cell line suggested that both mAb did not react with identical epitopes since no blocking effects could be observed (Supplementary Fig. 3). Overall, 8D2 only identified a subset of γδ T cells in splenocytes, PBL and IEL. Our analysis also showed that the frequency of 8D2$^+$ cells varied between individual chickens, as did the frequency of TCR1$^+$ cells, which is also influenced by age and sex of the animals. While the frequency of positive cells was variable between chickens in all organs, the two markers were positively correlated. Together, these data indicated that the 8D2 mAb is specific for a γδ T cell subset.

We also detected some 8D2$^+$TCR1$^-$ cells in all tissues. These cells were classified as TCR1-negative by gates set using the negative control staining (Supplementary Fig. 4). However, their fluorescent intensity was close to the threshold set by the gate, suggesting that they were poorly stained by the TCR1 mAb but should be considered γδ TCR$^+$ cells. These results indicate that staining of tissues with the TCR1-PE labeled mAb may fail to detect all γδ T cells, highlighting a note of caution for future staining experiments with this TCR1 mAb.

3.2. 8D2 mAb recognizes the Vγ3-and Vδ1-family

Based on the staining profile of 8D2 in combination with TCR1, we hypothesized that the 8D2 mAb recognizes an epitope on the TCR formed by specific TCRγ or TCRδ chains. To further test this hypothesis, splenocytes from two chickens were sorted into three populations by their TCR1 and 8D2 expression: TCR1$^+$8D2$^-$, TCR1$^+$8D2$^+$ and TCR1$^-$8D2$^+$. Each of these sorted subsets was analyzed for their V(D)J gene expression by TCR profiling using a recently established protocol (Früh et al., 2024).

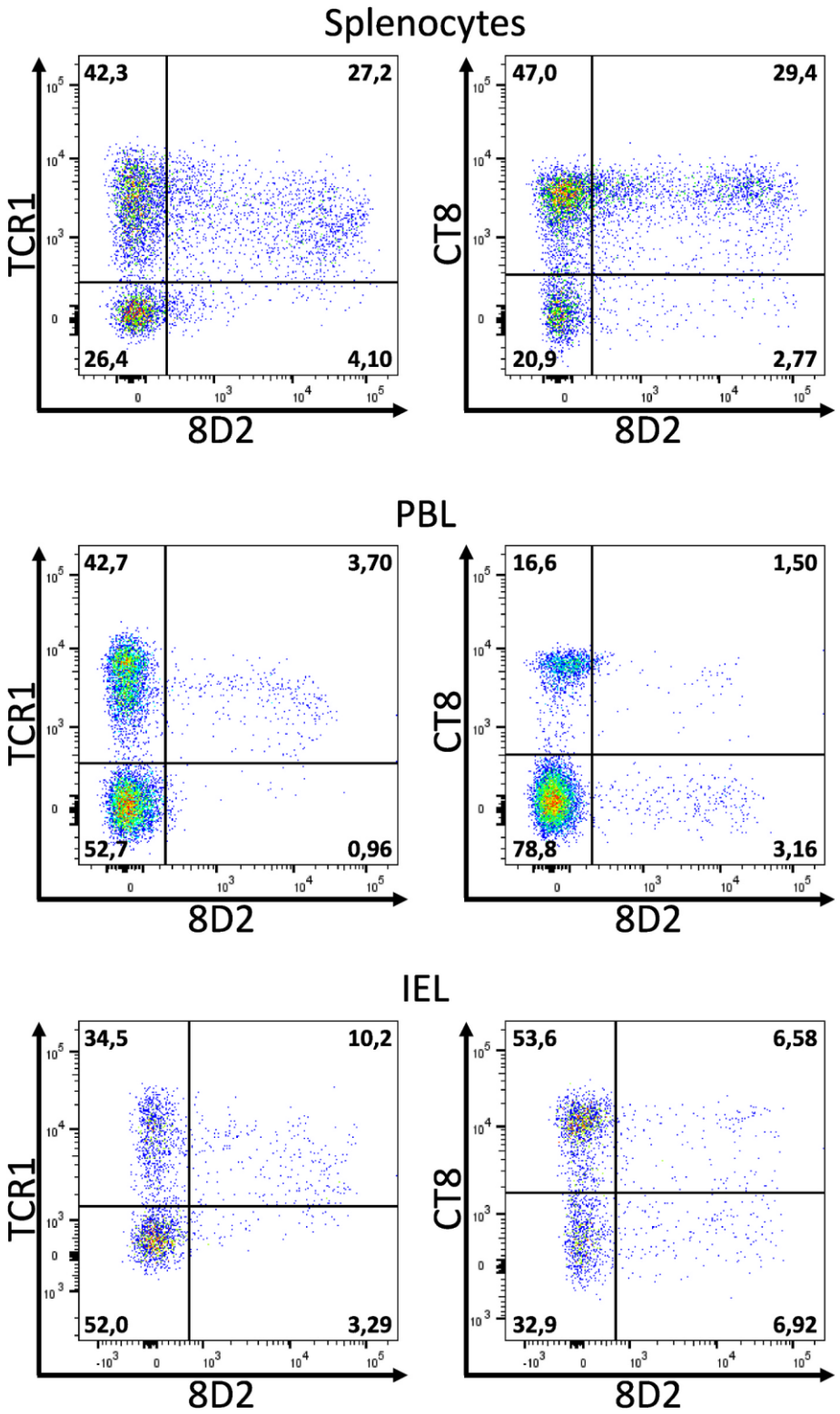


Fig. 2. The 8D2 mAb specifically reacts with γδ T cell subsets in various tissues.
Flow cytometry staining showing 8D2 expression on primary chicken cells compared to TCRγδ (clone TCR1, left panel) or CD8 (clone CT8, right panel) expression, with percentages of live single $CD3^+$ cells (splenocytes and PBL, top and middle panel), or of live single $CD45^+CD3^+$ cells (IEL, bottom panel) indicated. For each organ, one representative staining of four animals is shown.

The DJ gene usage was similar across all three populations. The most prevalent J gene in all six samples was Jγ3 comprising roughly 60% of the whole Jγ repertoire (Supplementary Fig. 5A). The Jγ2 gene was expressed in the remaining ~40%, while Jγ1 was rarely expressed (Supplementary Fig. 5A). In delta chains the most prevalent J gene was Jδ1 comprising ~82% of the whole Jδ repertoire in all samples (Supplementary Fig. 5B). The most frequent Dδ gene was Dδ2 which was expressed in about 90% of Dδ repertoire across all six samples (Supplementary Fig. 5C).

Strikingly, however, V gene usage was strongly biased in $8D2^+$ cells.

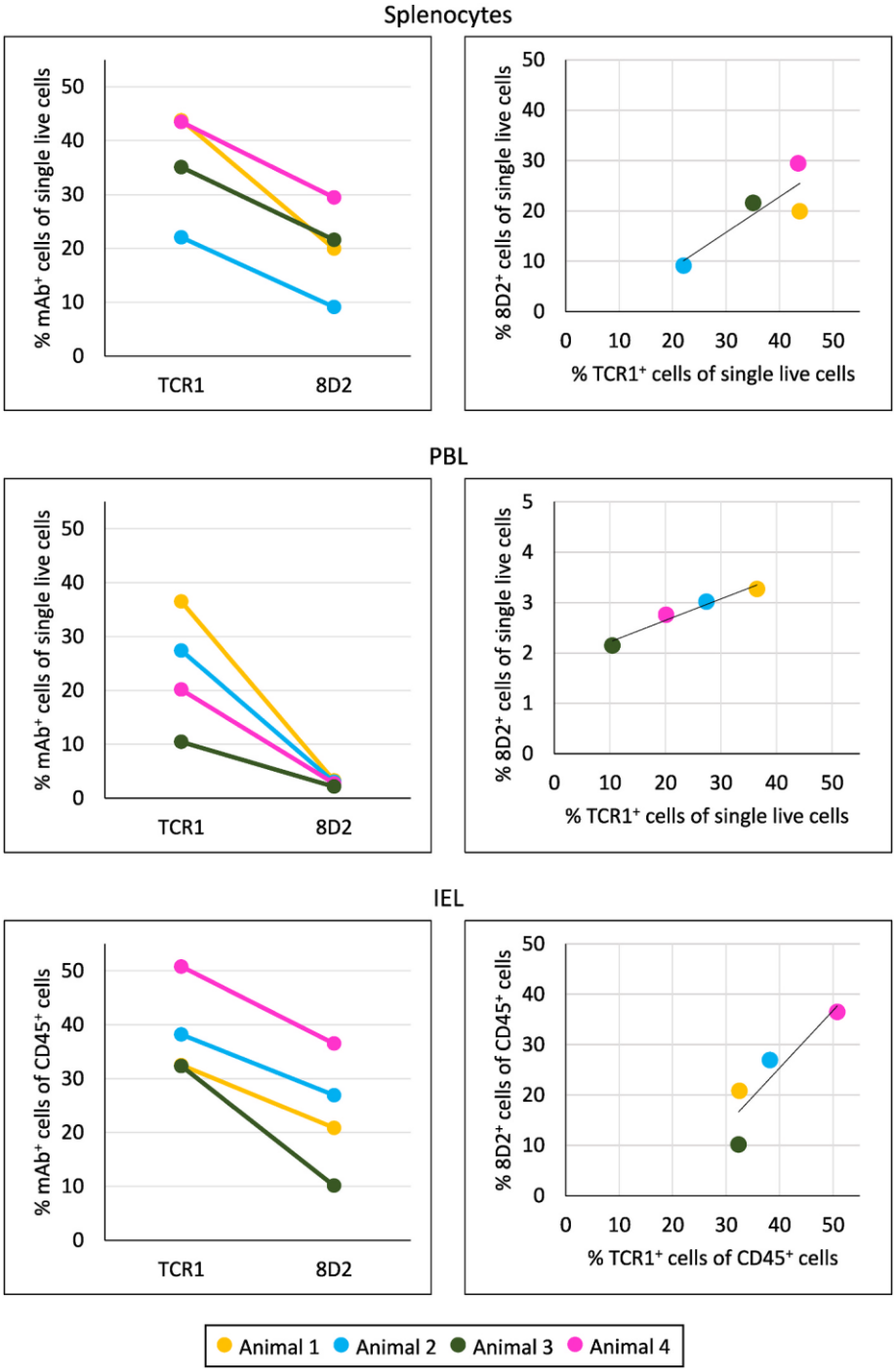


Fig. 3. The frequencies of 8D2$^+$ and TCR1$^+$ cells are positively correlated on splenocytes, PBL and IEL.
Flow cytometry staining showing the frequencies of positive cells in splenocytes, PBL and IEL stained with clones 8D2 and TCR1. The data are presented as percentage of positive cells grouped by the marker (left panel) and as a scatterplot of frequencies (right panel); n = 4 biological replicates.

While Vγ- and Vδ-expression was comparable in TCR1$^+$8D2$^+$ and TCR1$^-$8D2$^+$ cells, the pattern differed significantly from the V gene distribution in TCR1$^+$8D2$^-$ cells (Fig. 4). In TCR1$^+$8D2$^-$ cells the four Vγ-families (Vγ1, Vγ2, Vγ3 and Vγ4) were represented at varying frequencies (Fig. 4) that are consistent with previous TCRγ expression data from the spleen (Früh et al., 2024). In this population, TRGV2-26 and the TRGV3-6 were most frequently used (Fig. 5A, Supplementary Fig. 6A). In TCR1$^+$8D2$^+$ cells, however, expression of Vγ1, Vγ2 and Vγ4 family members was strongly reduced, and most V genes belonged to the Vγ3-family (Fig. 4), with TRGV3-5 being predominant (Fig. 5A, Supplementary Fig. 6B). Likewise, in TCR1$^-$8D2$^+$ cells the TCRγ repertoire was almost exclusively comprised of Vγ3-family members (Figs. 4 and 5A, Supplementary Fig. 6C), with TRGV3-5 and TRGV3-8 being among the most frequent genes (Fig. 5A, Supplementary Fig. 6C). A similar bias was observed in the expression of Vδ genes in both TCR1$^-$8D2$^+$ and TCR1$^+$8D2$^+$ cells, where TRDV1-2 was most frequently used (Fig. 5B, Supplementary Figs. 7B and 7C). This gene was also present in TCR1$^+$8D2$^-$ cells but less frequently. TRDV1-17 was frequently expressed in TCR1$^+$8D2$^-$ cells, but not in 8D2$^+$ cells (Fig. 5B, Supplementary Fig. 7A).

Similar to the individual bias in the prevalence of Vγ/Vδ and Jγ/Jδ, specific combinations of V and J genes were also preferentially used in

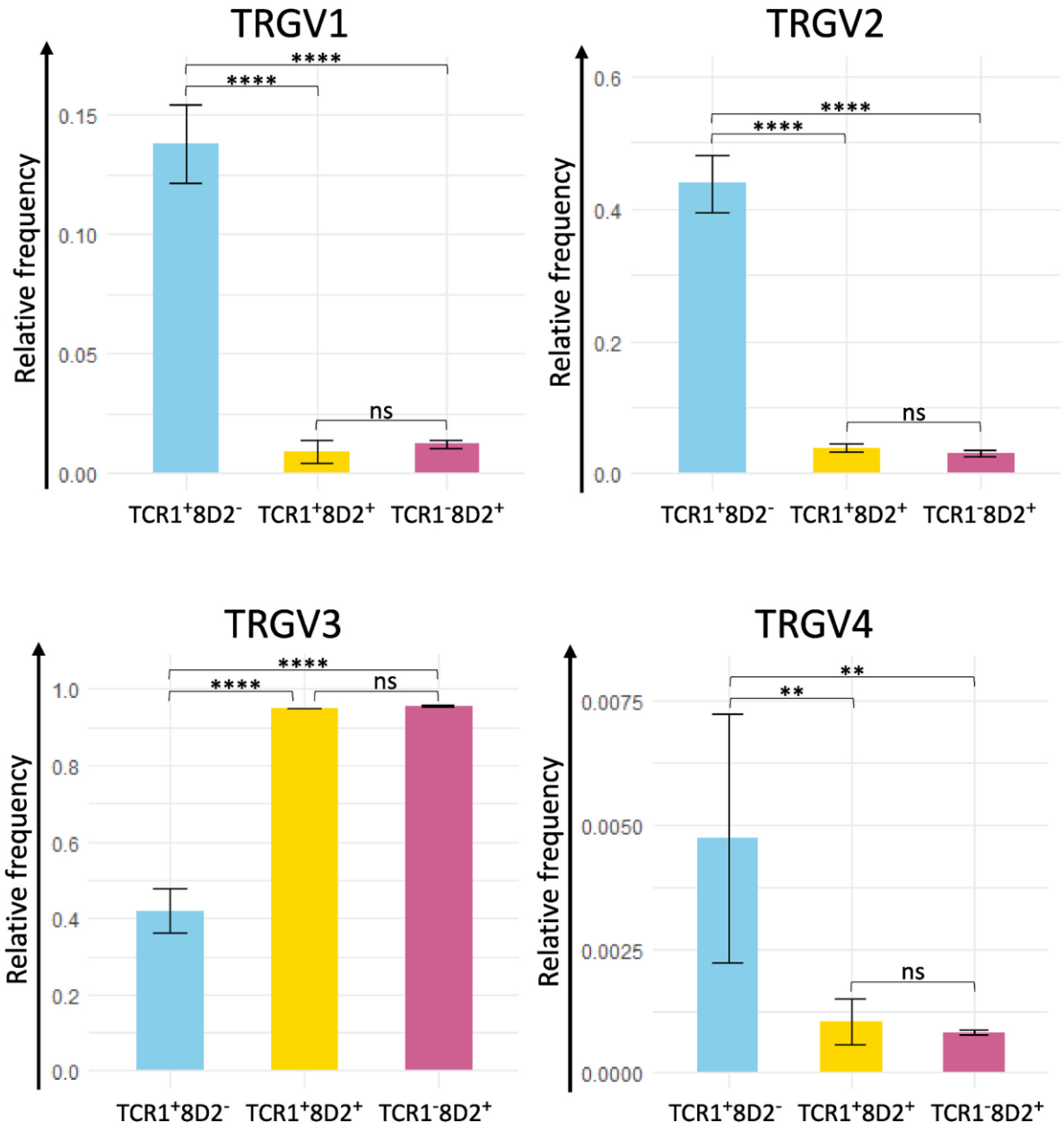


Fig. 4. 8D2^{+} cells primarily express Vγ3 TCR.
Splenocytes from two animals were sorted according to their TCR1 and 8D2 reactivity into three distinct populations, as indicated. The relative frequency of V gene family usage within these three subsets is shown. Note: each scale is different. Animals = 2. Mean ± SD; p-values as indicated, **** = $p \leq 0.0001$, ** = $p \leq 0.01$, ns = not significant = $p > 0.05$.

8D2^{+} vs. 8D2^{-} cells (Fig. 5). TCR1^{-}8D2^{+} and TCR1^{+}8D2^{+} cells were remarkably similar, with the most prevalent combinations being TRGV3-5, TRGV3-8 and TRGV3-10, each paired with TRGJ3 (Fig. 5A). In TCR1^{+}8D2^{+} cells, the combination of TRGV3-6 with TRGJ3 also occurred frequently. This VJ pairing was also found in TCR1^{+}8D2^{-} cells, however, the most prevalent combination in these cells was TRGV2-26 with TRGJ3, a combination which was rare in 8D2^{+} cells (Fig. 5A).

Similar to the γ chain, the pairing of Vδ and Jδ genes in TCR1^{-}8D2^{+} and TCR1^{+}8D2^{+}cells was comparable. In both populations, the following combinations were most frequently used: TRDV1-2, TRDV1-5, TRDV1-9 and TRDV1-25, each preferentially paired with TRDJ1 (Fig. 5B). TRDV1-2 – TRDJ1 was most prevalent, but this pairing was also frequently found in the TCR1^{+}8D2^{-} cells along with the following combinations: TRDV1-17 with TRDJ1 and TRDV1-25 with the TRDJ1 (Fig. 5B).

There have been only a few previous reports about the γδ TCR repertoire expressed in chickens (Dixon et al., 2021; Zhang et al., 2021; Früh et al., 2024; Linti et al., 2024). Zhang et al. examined the repertoire in the thymus and discovered that multiple genes from different families are preferentially expressed, with members of the Vγ3 subgroup dominating (Zhang et al., 2021). Dixon et al. described the TRGV3 family as the dominant family in all tissues tested, identifying TRGV3.3 as the most frequent gene, comprising 30–40% of the entire TCR gamma repertoire (Dixon et al., 2021). In our study we identified several frequently occurring genes in TCR1^{+}8D2^{-} cells, rather than a single prominent gene. Dixon et al. and Zhang et al. used different chicken lines and protocols for TCR analysis, and another nomenclature, which may explain the differences highlighted here.

The results from previous work from our laboratory by Früh et al. and Linti et al., using the same chicken genome sequences, however,

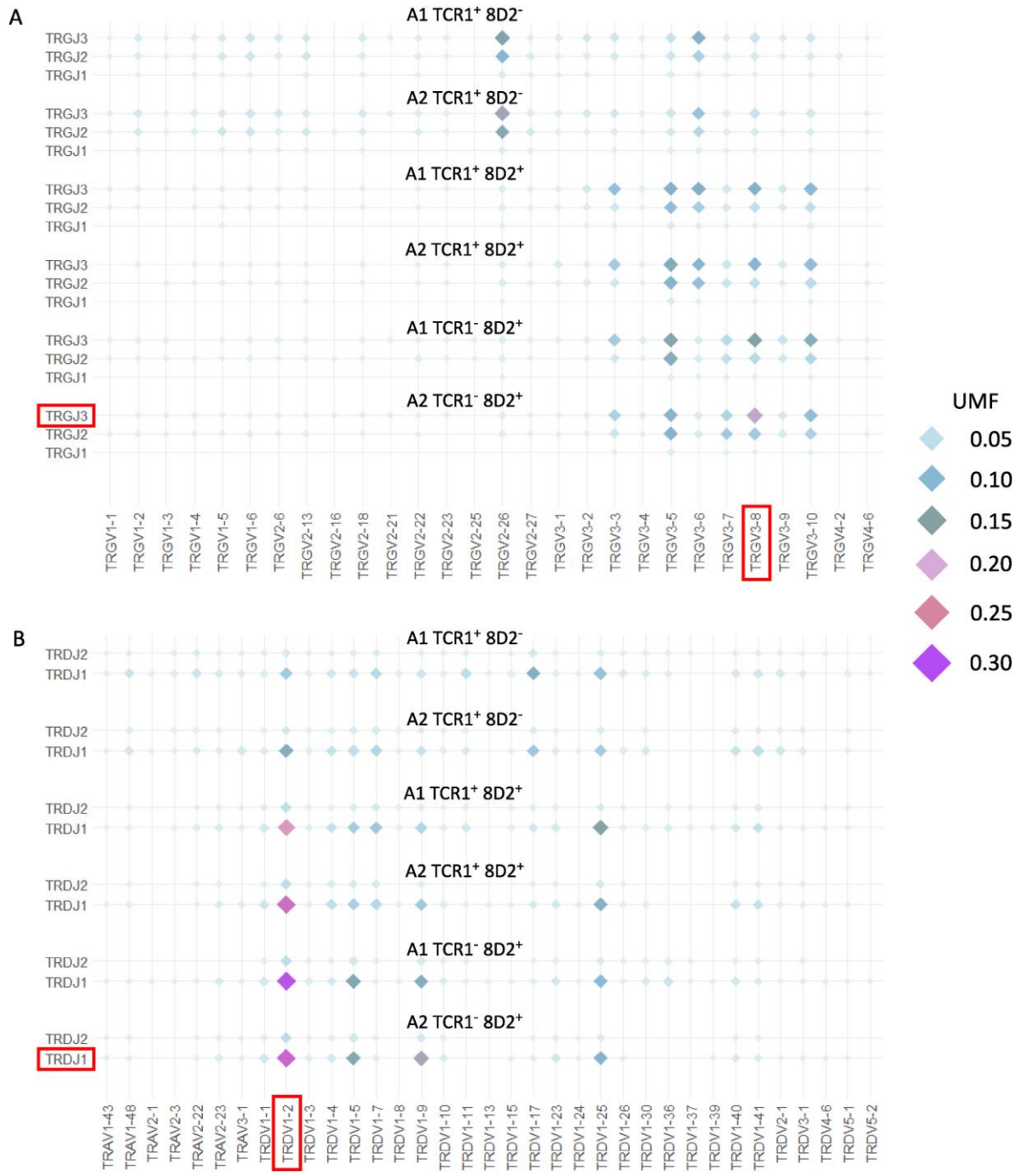


Fig. 5. Analysis of the most common TCRγ and TCRδ V-J gene combinations in sorted γδ T cell subsets.
Splenocytes from two animals (A1, A2) were sorted according to their TCR1 and 8D2 reactivity into three distinct populations, as indicated. The bubble grid plots show the frequency of different combinations of Vγ and Jγ genes (A) and Vδ and Jδ genes (B), with J genes depicted on the y-axis and V genes on the x-axis. The color and size of the symbols correspond to the frequency of each specific combination. The Unique Molecule Fraction (UMF) was calculated as the fraction of the unique molecule count of a single clonotype relative to the total sum of unique molecule counts within the sample. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

were overall consistent with the data presented in this study (Früh et al., 2024; Linti et al., 2024). In all studies a bias towards TRGJ3 and TRDJ1 was observed. In addition, TRGV2-26, TRGV3-5 and TRGV3-6 were the most prevalent genes reported in these two studies. Likewise, in this study TRGV2-26 and TRGV3-6 were by far the most frequently used genes in TCR1^{+}8D2^{-} cells. In TCR1^{-}8D2^{+} cells, TRGV3-5 was the most common Vγ gene together with TRGV3-8, that also occurred at varying frequencies in the other two studies. The two previous papers reported different Vδ genes as most prevalent. Linti et al. identified TRDV1-2 as the most prevalent, while Früh et al. reported TRDV1-25 as the most common Vδ gene. Both, TRDV1-2 and TRDV1-25 were among the most frequent V genes in the TCR1^{+}8D2^{-} cells in our study.

In summary, 8D2^{+} cells primarily, though not exclusively, expressed genes of the Vγ3-family and were enriched for particular Vδ genes, while TCR with Vγ1-, Vγ2- and Vγ4-family genes were poorly bound by 8D2.

3.3. 8D2 mAb recognizes a Vγ3 cell line, but no Vγ1 and Vγ2 cell lines

To confirm that 8D2 specifically binds the chicken γδ TCR bearing a Vγ3 gene, we established a stable cell line expressing a TCR comprised of TRGV3-8, TRGJ3, TRDV1-2 and TRDJ1 (Fig. 6A), since these combinations were noticeably more prevalent in the TCR1$^-$8D2$^+$ cells compared to the other two populations (Fig. 5). For this purpose, a plasmid was constructed that expresses all elements needed for surface expression of the TCR/CD3 complex, namely the CD3γδ, CD3ε and CD3ζ genes, each separated by ribosomal skipping 2a elements. The TCRγ and TCRδ genes were expressed under a second promotor (Supplementary Fig. 2). Stable clones after selection were analyzed for their CD3 expression and one cell line was further propagated.

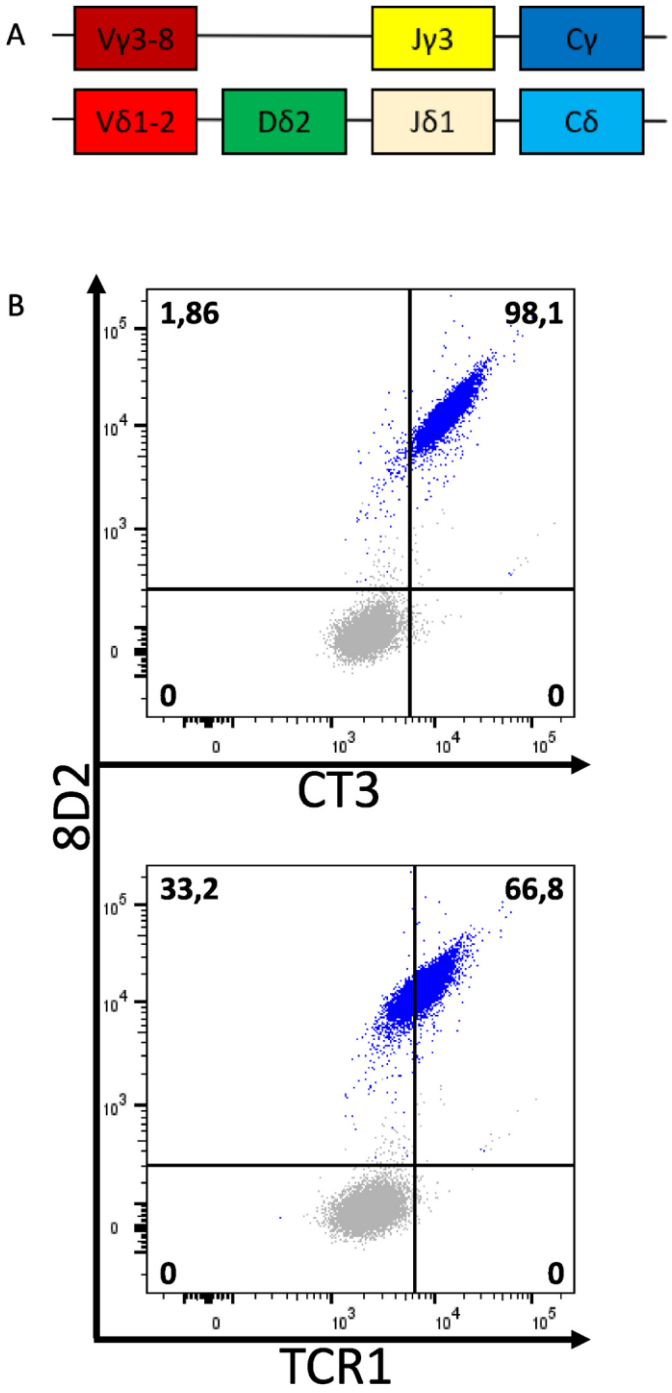


Fig. 6. 8D2 reacts with a stable cell line expressing a Vγ3 TCR.
(A) Schematic representation of the selected γ and δ chains used for transfection. (B) Flow cytometry staining of Vγ3-expressing HEK293 cells using 8D2 in combination with either CT3 (upper panel) or TCR1 (lower panel). Live single cells are shown with the percentage of positive cells indicated. One representative experiment of n = 3 replicates is shown. Blue = stained sample, grey = unstained control. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Double staining with 8D2 and either CT3 or TCR1 was performed on this cell line (Fig. 6B). All CT3$^+$ and TCR1$^+$ cells were also positive for 8D2. The mean correlation coefficient was 0,78 for 8D2 with TCR1 and 0,86 for 8D2 with CT3 (n = 2). Thus, the expression of 8D2 and either TCR1 or CT3 were strongly correlated on this cell line, confirming the trend observed on splenocytes, PBL and IEL (Fig. 3).

We also stained cell lines expressing a Vγ1 or Vγ2 family member γδ TCR previously generated in our laboratory (Fenzl et al., 2017) with 8D2 and TCR1. Approximately 26–28% of the cells reacted with the TCR1 mAb, whereas they barely reacted with the 8D2 mAb (Fig. 7). However, nearly 100% of the Vγ3 cell line were TCR1$^+$ and 8D2$^+$ (Fig. 7).

These results indicated that the chicken 8D2 mAb specifically reacted with γδ T cells utilizing Vγ3 family members. Specific γδ T cell markers also exist for humans (e.g. clone 5A6.E9) and mice (e.g. clone UC7-13D5), which are utilized in many studies (Peterman et al., 1993; Dutta et al., 2017). Furthermore, several Vγ and Vδ TCR-specific mAb are available for humans (Jitsukawa et al., 1987; Miossec et al., 1990; Moretta et al., 1991), including Vγ9-specific (e.g. clone TiγA), Vδ1-specific (e.g. clone A13) and Vδ2-specific (e.g. clone anti-TiVδ2) mAb. Please note that human Vγ9 is also referred to as human Vγ2 in another nomenclature. Unfortunately, mAb for specific Vγ and Vδ TCR have not been available for chickens until now. However, this study identifies the first Vγ3 TCR-specific mAb.

This novel mAb was also evaluated in techniques beyond flow cytometry surface staining. Preliminary data indicated that the antibody can be used in immunohistochemistry and in intracellular stainings. 8D2 can therefore be used in combination with mAb against intracellular antigens, as fixation and permeabilization of splenocytes did not alter the preceding surface staining. Additionally, the mAb also stained intracellularly after fixation and permeabilization. Whether 8D2 can be used for Western blots or fluorescence microscopy has not yet been investigated.

In conclusion, here we describe a novel mAb 8D2 that specifically stains a γδ T cell subset expressing Vγ3 family TCR. Some of these cells may be poorly detected by the TCR1 mAb. This mAb could be instrumental in further delineating γδ T cell subsets across various organs and in characterizing the dynamics of these subsets during infections.

Funding

The authors declare that financial support was received for the conduct of the research 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) through the project GO 489/7-1 awarded to TWG.

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.

CRediT authorship contribution statement

Veronika E.M. Drexel: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Thomas W. Göbel:** Writing – review & editing, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Simon P. Früh:** Writing – review & editing, Formal analysis, Conceptualization.

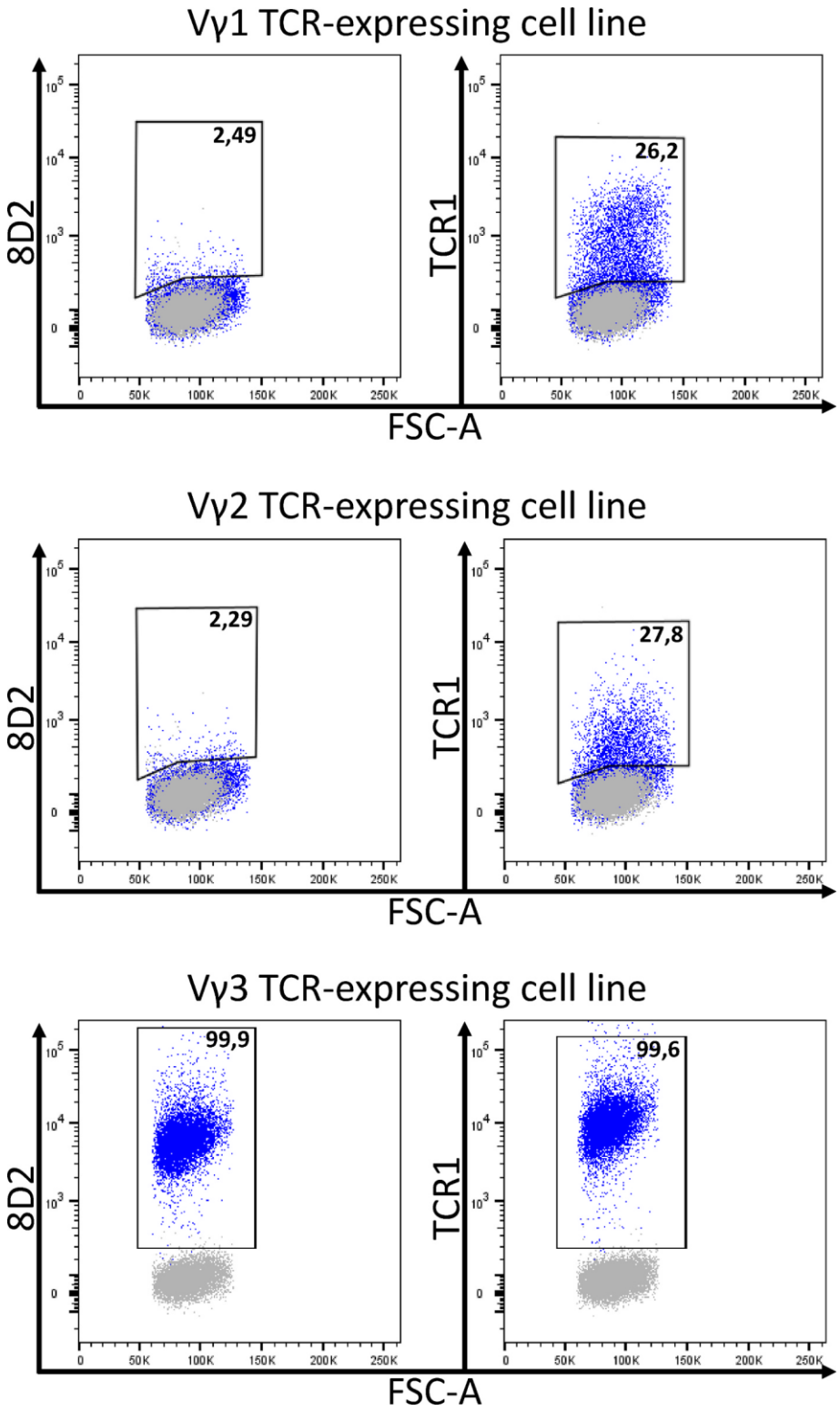


Fig. 7. Reactivity of Vγ1-, Vγ2- and Vγ3-expressing cell lines with 8D2 and TCR1.
Vγ1-, Vγ2- and Vγ3-expressing cell lines were stained with 8D2 (left panel) and TCR1 (right panel) mAb. The percentage of positive cells is indicated. Blue = stained sample, grey = unstained control. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the authors used ChatGPT (https://chat.openai.com/) in order to improve readability and language, with no contribution to the scientific content. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the published article.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank Daniela Huhle for generating and providing the 8D2 mAb and Anna Hegele and Antonia Linti for their contributions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105250.

References

Andersen, S.H., Vervelde, L., Sutton, K., Norup, L.R., Wattrang, E., Juul-Madsen, H.R., Dalgaard, T.S., 2017. Quantification and phenotypic characterisation of peripheral IFN-γ producing leucocytes in chickens vaccinated against Newcastle disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 193–194, 18–28. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.10.001.

Andrew, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Retrieved from. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

Arstila, T.P., Lassila, O., 1993. Androgen-induced expression of the peripheral blood gamma delta T cell population in the chicken. J. Immunol. 151 (12), 6627–6633. https://doi.org/10.4049/jimmunol.151.12.6627.

Becton, Dickinson and Company, 2023. FlowJo(TM) Software (For Windows) Version 10.9.0.

Berndt, A., Pieper, J., Methner, U., 2006. Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. Infect. Immun. 74 (7), 3967–3978. https://doi.org/10.1128/iai.01128-05.

Bolotin, D.A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I.Z., Putintseva, E. V., Chudakov, D.M., 2015. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. Nat. Methods 12 (5), 380–381. https://doi.org/10.1038/nmeth.3364.

Braukmann, M., Methner, U., Berndt, A., 2015. Avian CD25(+) gamma/delta (γδ) T cells after Salmonella exposure. Vet. Immunol. Immunopathol. 168 (1–2), 14–18. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.09.010.

Bucy, R.P., Chen, C.L., Cihak, J., Lösch, U., Cooper, M.D., 1988. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. J. Immunol. 141 (7), 2200–2205. https://doi.org/10.4049/jimmunol.141.7.2200.

Bucy, R.P., Chen, C.L., Cooper, M.D., 1989. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. J. Immunol. 142 (9), 3045–3049.

Caro, M.R., Gallego, M.C., Buendía, A.J., Navarro, E., Navarro, J.A., 1998. Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. Res. Vet. Sci. 65 (2), 145–148. https://doi.org/10.1016/s0034-5288(98)90166-7.

Chan, M.M., Chen, C.L., Ager, L.L., Cooper, M.D., 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. J. Immunol. 140 (7), 2133–2138. https://doi.org/10.4049/jimmunol.140.7.2133.

Chen, C.H., Göbel, T.W., Kubota, T., Cooper, M.D., 1994. T cell development in the chicken. Poultry Sci. 73 (7), 1012–1018. https://doi.org/10.3382/ps.0731012.

Chen, C.H., Six, A., Kubota, T., Tsuji, S., Kong, F.K., Göbel, T.W., Cooper, M.D., 1996. T cell receptors and T cell development. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 212, 37–53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80057-3_5.

Chen, C.H., Sowder, J.T., Lahti, J.M., Cihak, J., Lösch, U., Cooper, M.D., 1989. TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (7), 2351–2355. https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2351.

Chen, C.L., Ager, L.L., Gartland, G.L., Cooper, M.D., 1986. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. J. Exp. Med. 164 (1), 375–380. https://doi.org/10.1084/jem.164.1.375.

Chen, C.L., Bucy, R.P., Cooper, M.D., 1990. T cell differentiation in birds. Semin. Immunol. 2 (1), 79–86.

Chen, C.L., Cihak, J., Lösch, U., Cooper, M.D., 1988. Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. Eur. J. Immunol. 18 (4), 539–543. https://doi.org/10.1002/eji.1830180408.

Chien, Y.H., Meyer, C., Bonneville, M., 2014. γδ T cells: first line of defense and beyond. Annu. Rev. Immunol. 32, 121–155. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120216.

Cihak, J., Lösch, U., Hoffmann-Fezer, G., Chen, C.H., Cooper, M.D., Ziegler-Heitbrock, H. W., 1993. In vivo depletion of chicken T-cell subsets. Scand. J. Immunol. 38 (2), 123–129. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1993.tb01702.x.

Cihak, J., Ziegler-Heitbrock, H.W., Trainer, H., Schranner, I., Merkenschlager, M., Lösch, U., 1988. Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. Eur. J. Immunol. 18 (4), 533–537. https://doi.org/10.1002/eji.1830180407.

Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., Fournié, J. J., 1994. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. Science 264 (5156), 267–270. https://doi.org/10.1126/science.8146660.

Cooper, M.D., Chen, C.L., Bucy, R.P., Thompson, C.B., 1991. Avian T cell ontogeny. Adv. Immunol. 50, 87–117. https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60823-8.

Dalgaard, T.S., Norup, L.R., Rubbenstroth, D., Wattrang, E., Juul-Madsen, H.R., 2010. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution. Vet. Immunol. Immunopathol. 138 (1–2), 85–94. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.07.010.

Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 334 (6181), 395–402. https://doi.org/10.1038/334395a0.

Dixon, R., Preston, S.G., Dascalu, S., Flammer, P.G., Fiddaman, S.R., McLoughlin, K., Boyd, A., Volf, J., Rychlik, I., Bonsall, M.B., Kaspers, B., Smith, A.L., 2021. Repertoire analysis of γδ 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 Genom. 22 (1), 719. https://doi.org/10.1186/s12864-021-08036-9.

Dutta, I., Postovit, L.M., Siegers, G.M., 2017. Apoptosis induced via gamma delta T cell antigen receptor "blocking" antibodies: a cautionary tale. Front. Immunol. 8, 776. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00776.

Fenzl, L., Göbel, T.W., Neulen, M.L., 2017. γδ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken. Dev. Comp. Immunol. 73, 175–183. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.028.

Fichtner, A.S., Ravens, S., Prinz, I., 2020. Human γδ TCR repertoires in Health and disease. Cells 9 (4). https://doi.org/10.3390/cells9040800.

Früh, S.P., Früh, M.A., Kaufer, B.B., Göbel, T.W., 2024. Unraveling the chicken T cell repertoire with enhanced genome annotation. Front. Immunol. 15, 1359169 https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1359169.

Göbel, T.W., 2000. Isolation and analysis of natural killer cells in chickens. Methods Mol. Biol. 121, 337–345. https://doi.org/10.1385/1-59259-044-6:337.

Göbel, T.W., Chen, C.L., Lahti, J., Kubota, T., Kuo, C.L., Aebersold, R., Hood, L., Cooper, M.D., 1994. Identification of T-cell receptor alpha-chain genes in the chicken. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (3), 1094–1098. https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1094.

Goodman, T., Lefrançois, L., 1988. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. Nature 333 (6176), 855–858. https://doi.org/10.1038/333855a0.

Hayday, A.C., 2000. γδ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. Annu. Rev. Immunol. 18, 975–1026. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.975.

Holoshitz, J., Romzek, N.C., Jia, Y., Wagner, L., Vila, L.M., Chen, S.J., Wilson, J.M., Karp, D.R., 1993. MHC-independent presentation of mycobacteria to human gamma delta T cells. Int. Immunol. 5 (11), 1437–1443. https://doi.org/10.1093/intimm/5.11.1437.

Huang, Z., Xu, Z., Bai, H., Huang, Y., Kang, N., Ding, X., Liu, J., Luo, H., Yang, C., Chen, W., Guo, Q., Xue, L., Zhang, X., Xu, L., Chen, M., Fu, H., Chen, Y., Yue, Z., Fukagawa, T., Liu, S., Chang, G., Xu, L., 2023. Evolutionary analysis of a complete chicken genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 120 (8), e2216641120 https://doi.org/10.1073/pnas.2216641120.

Huhle, D., Hirmer, S., Göbel, T.W., 2017. Splenic γδ T cell subsets can be separated by a novel mab specific for two CD45 isoforms. Dev. Comp. Immunol. 77, 229–240. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.08.013.

Jitsukawa, S., Faure, F., Lipinski, M., Triebel, F., Hercend, T., 1987. A novel subset of human lymphocytes with a T cell receptor-gamma complex. J. Exp. Med. 166 (4), 1192–1197. https://doi.org/10.1084/jem.166.4.1192.

Kasahara, Y., Chen, C.H., Cooper, M.D., 1993. Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming. Eur. J. Immunol. 23 (9), 2230–2236. https://doi.org/10.1002/eji.1830230927.

Kim, S., Lim, B., Mattoo, S.U., Oh, E.Y., Jeong, C.G., Kim, W.I., Lee, K.T., Lee, S.M., Kim, J.M., 2021. Comprehensive transcriptomic comparison between porcine CD8(-) and CD8(+) gamma delta T cells revealed distinct immune phenotype. Animals (Basel) 11 (8). https://doi.org/10.3390/ani11082165.

Kowarz, E., Löscher, D., Marschalek, R., 2015. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. Biotechnol. J. 10 (4), 647–653. https://doi.org/10.1002/biot.201400821.

Kubota, T., Wang, J., Göbel, T.W., Hockett, R.D., Cooper, M.D., Chen, C.H., 1999. Characterization of an avian (Gallus gallus domesticus) TCR alpha delta gene locus. J. Immunol. 163 (7), 3858–3866. https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.7.3858.

Kumar, B.V., Connors, T.J., Farber, D.L., 2018. Human T cell development, localization, and function throughout life. Immunity 48 (2), 202–213. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007.

Lahti, J.M., Chen, C.L., Tjoelker, L.W., Pickel, J.M., Schat, K.A., Calnek, B.W., Thompson, C.B., Cooper, M.D., 1991. Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (23), 10956–10960. https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10956.

Laursen, A.M.S., Kulkarni, R.R., Taha-Abdelaziz, K., Plattner, B.L., Read, L.R., Sharif, S., 2018. Characterizaton of gamma delta T cells in Marek's disease virus (Gallid herpesvirus 2) infection of chickens. Virology 522, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.014.

Lenth, R.V., Bolker, B., Buerkner, P., Giné-Vázquez, I., Herve, M., Jung, M., Love, J., Miguez, F., Piaskowski, J., Riebl, H., Singmann, H., 2024. Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. Retrieved from. https://CRAN.R-project.org/package=emmeans.

Linti, A.E., Göbel, T.W., Früh, S.P., 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 https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1325024.

Liu, F., Li, J., Lin, I.Y.C., Yang, X., Ma, J., Chen, Y., Lv, N., Shi, Y., Gao, G.F., Zhu, B., 2020. The genome resequencing of TCR loci in Gallus gallus revealed their distinct evolutionary features in avians. Immunohorizons 4 (1), 33–46. https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1900095.

Mackay, C.R., Hein, W.R., 1989. 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. 1 (5), 540–545. https://doi.org/10.1093/intimm/1.5.540.

Mamedov, I.Z., Britanova, O.V., Zvyagin, I.V., Turchaninova, M.A., Bolotin, D.A., Putintseva, E.V., Lebedev, Y.B., Chudakov, D.M., 2013. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. Front. Immunol. 4, 456. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00456.

Marmor, M.D., Benatar, T., Ratcliffe, M.J., 1993. Retroviral transformation in vitro of chicken T cells expressing either alpha/beta or gamma/delta T cell receptors by reticuloendotheliosis virus strain T. J. Exp. Med. 177 (3), 647–656. https://doi.org/10.1084/jem.177.3.647.

Matsuyama-Kato, A., Iseki, H., Boodhoo, N., Bavananthasivam, J., Alqazlan, N., Abdul-Careem, M.F., Plattner, B.L., Behboudi, S., Sharif, S., 2022. Phenotypic characterization of gamma delta (γδ) T cells in chickens infected with or vaccinated against Marek's disease virus. Virology 568, 115–125. https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.01.012.

Matsuyama-Kato, A., Shojadoost, B., Boodhoo, N., Raj, S., Alizadeh, M., Fazel, F., Fletcher, C., Zheng, J., Gupta, B., Abdul-Careem, M.F., Plattner, B.L., Behboudi, S., Sharif, S., 2023. Activated chicken gamma delta T cells are involved in protective immunity against marek's disease. Viruses 15 (2). https://doi.org/10.3390/v15020285.

McClure, S.J., Hein, W.R., Yamaguchi, K., Dudler, L., Beya, M.F., Miyasaka, M., 1989. Ontogeny, morphology and tissue distribution of a unique subset of CD4-CD8- sheep T lymphocytes. Immunol. Cell Biol. 67 (Pt 4), 215–221. https://doi.org/10.1038/icb.1989.33.

Migalska, M., Sebastian, A., Radwan, J., 2018. Profiling of the TCRβ repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. Sci. Rep. 8 (1), 11613 https://doi.org/10.1038/s41598-018-30037-0.

Miossec, C., Faure, F., Ferradini, L., Roman-Roman, S., Jitsukawa, S., Ferrini, S., Moretta, A., Triebel, F., Hercend, T., 1990. Further analysis of the T cell receptor gamma/delta+ peripheral lymphocyte subset. The V delta 1 gene segment is expressed with either C alpha or C delta. J. Exp. Med. 171 (4), 1171–1188. https://doi.org/10.1084/jem.171.4.1171.

Moretta, L., Ciccone, E., Ferrini, S., Pelicci, P.G., Mingari, M.C., Zeromski, J., Bottino, C., Grossi, C., Moretta, A., 1991. Molecular and cellular analysis of human T lymphocytes expressing gamma delta T-cell receptor. Immunol. Rev. 120, 117–135. https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1991.tb00590.x.

Nazarov, V., Tsvetkov, V., Fiadziushchanka, S., Rumynskiy, E., Popov, A., Balashov, I., Samokhina, M., 2023. Immunarch: Bioinformatics Analysis of T-Cell and B-Cell Immune Repertoires. https://doi.org/10.5281/zenodo.3367200.

Parra, Z.E., Miller, R.D., 2012. Comparative analysis of the chicken TCRα/δ locus. Immunogenetics 64 (8), 641–645. https://doi.org/10.1007/s00251-012-0621-5.

Parra, Z.E., Mitchell, K., Dalloul, R.A., Miller, R.D., 2012. A second TCRδ locus in Galliformes uses antibody-like V domains: insight into the evolution of TCRδ and TCRμ genes in tetrapods. J. Immunol. 188 (8), 3912–3919. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103521.

Peterman, G.M., Spencer, C., Sperling, A.I., Bluestone, J.A., 1993. Role of gamma delta T cells in murine collagen-induced arthritis. J. Immunol. 151 (11), 6546–6558.

Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. Vet. Res. 39 (6), 54. https://doi.org/10.1051/vetres:2008030.

Schatz, D.G., Swanson, P.C., 2011. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. Annu. Rev. Genet. 45, 167–202. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552.

Shekhar, S., Milling, S., Yang, X., 2012. Migration of γδ T cells in steady-state conditions. Vet. Immunol. Immunopathol. 147 (1–2), 1–5. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.016.

Sireci, G., Espinosa, E., Di Sano, C., Dieli, F., Fournié, J.J., Salerno, A., 2001. Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens. Eur. J. Immunol. 31 (5), 1628–1635. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1628::Aid-immu1628>3.0.Co;2-t.

Six, A., Rast, J.P., McCormack, W.T., Dunon, D., Courtois, D., Li, Y., Chen, C.H., Cooper, M.D., 1996. Characterization of avian T-cell receptor gamma genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (26), 15329–15334. https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15329.

Sowder, J.T., Chen, C.L., Ager, L.L., Chan, M.M., Cooper, M.D., 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. J. Exp. Med. 167 (2), 315–322. https://doi.org/10.1084/jem.167.2.315.

Tanaka, Y., Morita, C.T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M.B., Bloom, B.R., 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. Nature 375 (6527), 155–158. https://doi.org/10.1038/375155a0.

Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature 302 (5909), 575–581. https://doi.org/10.1038/302575a0.

Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. Modern Applied Statistics with S, fourth ed. Springer, New York. Retrieved from. https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/.

Viertlboeck, B.C., Göbel, T.W., 2007. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. Vet. Immunol. Immunopathol. 119 (1–2), 137–141. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.017.

Zhang, T., Li, Q., Li, X., Kang, L., Jiang, Y., Sun, Y., 2021. Characterization of the chicken T cell receptor γ repertoire by high-throughput sequencing. BMC Genom. 22 (1), 683. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07975-7.

Zhang, T., Liu, G., Wei, Z., Wang, Y., Kang, L., Jiang, Y., Sun, Y., 2020. Genomic organization of the chicken TCRβ locus originated by duplication of a Vβ segment combined with a trypsinogen gene. Vet. Immunol. Immunopathol. 219, 109974 https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109974.

5. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Die ergänzenden Unterlagen zu der Publikation „Characterization of a novel chicken γδ TCR-specific marker“, die 2024 in dem Journal „Developmental and Comparative Immunology“ veröffentlicht wurden (DOI: 10.1016/j.dci.2024.105250), sind auf den folgenden Seiten zu finden.

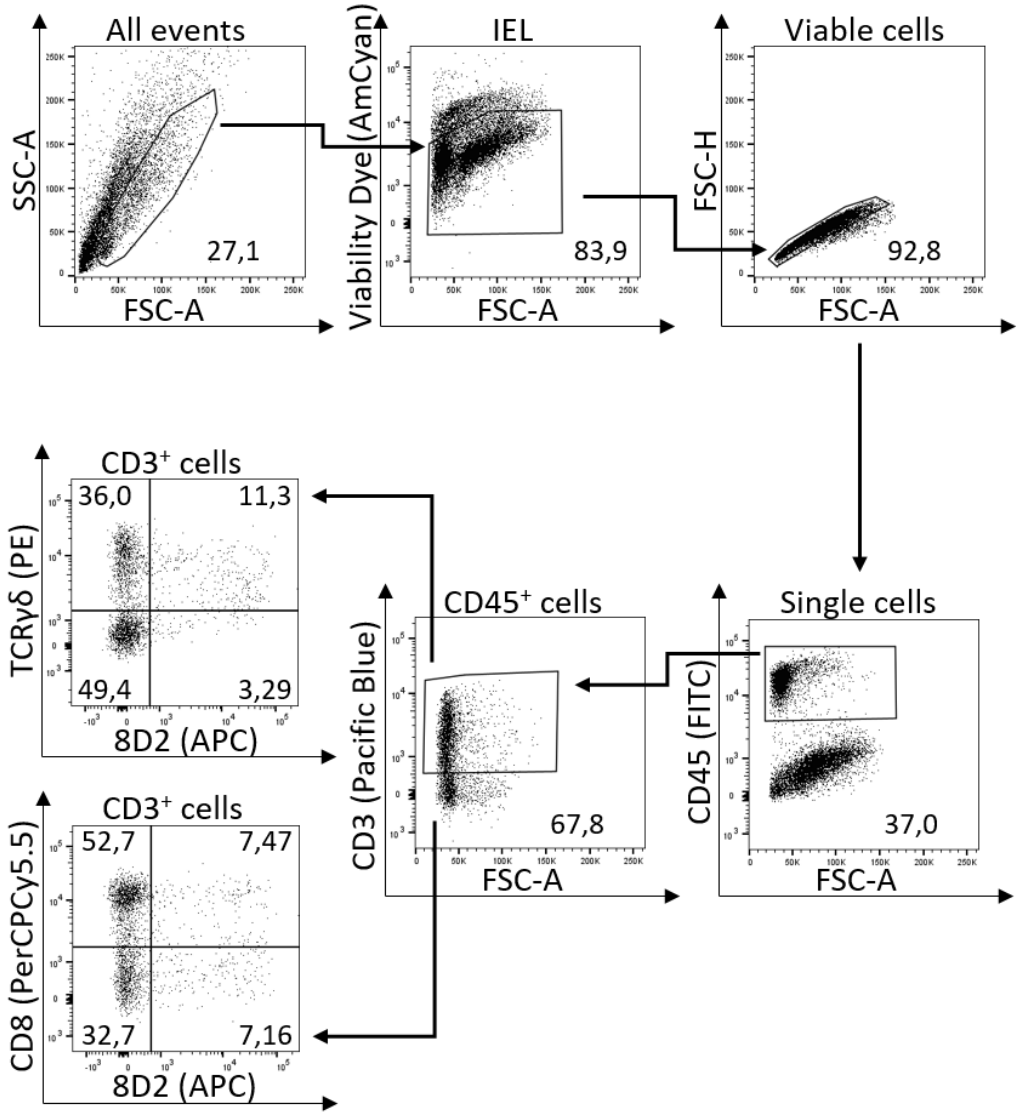
Characterization of a novel chicken γδ TCR-specific marker

Veronika E.M. Drexel[a], Thomas W. Göbel[a], Simon P. Früh[a, b]

[a]Department of Veterinary Immunology, LMU Munich, Lena-Christ-Straße 48, 82152 Planegg-Martinsried, Germany
[b]Department of Veterinary Medicine, Institute of Virology, FU Berlin, Robert-von-Ostertag-Straße 7, 14163 Berlin, Germany

Supplementary materials

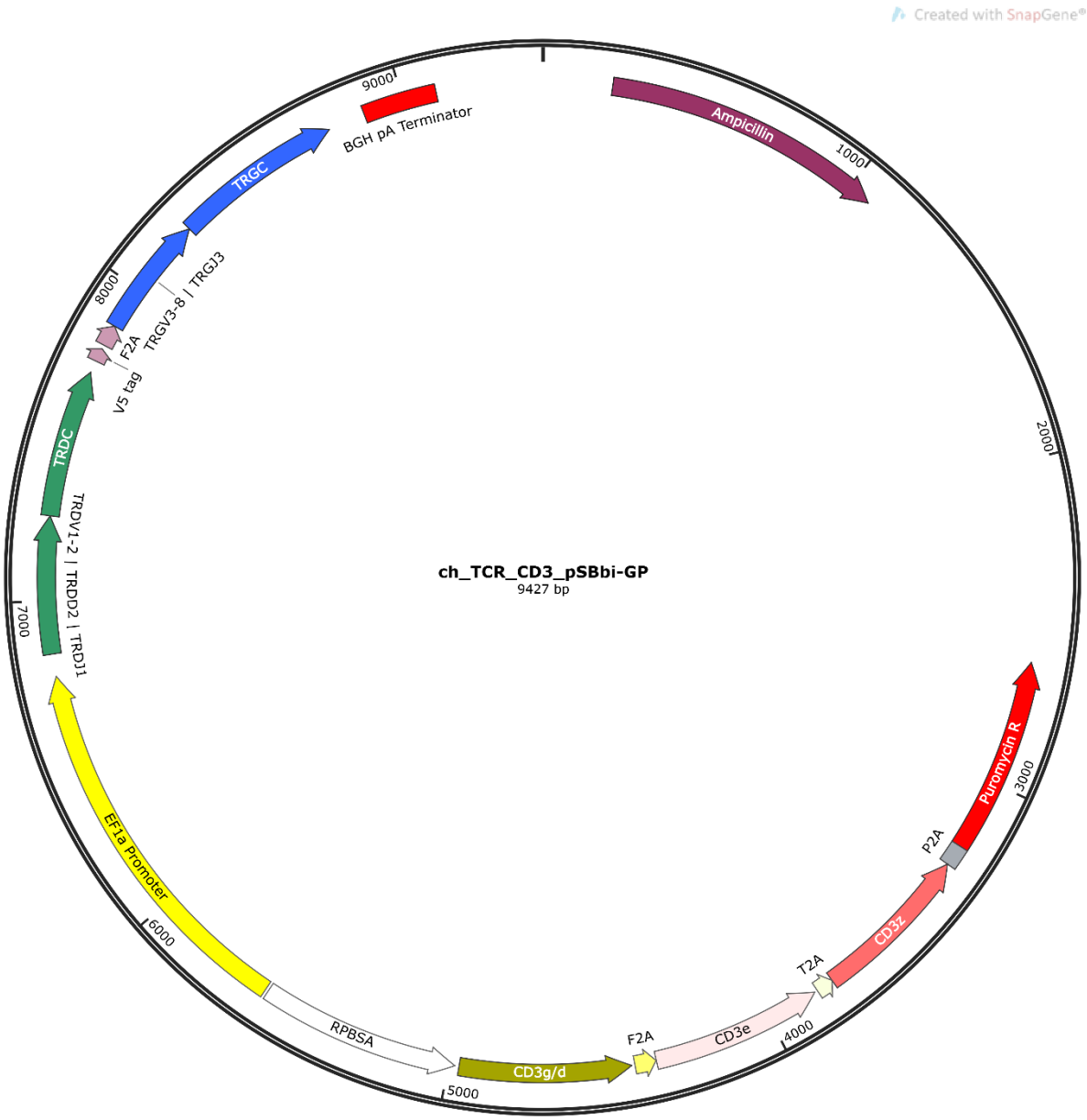
Supplementary Figure 1



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

Gating strategy for the staining of IEL with frequencies indicated as a percentage. Staining of splenocytes and PBL was performed similarly, except that the anti-CD45 mAb was omitted.

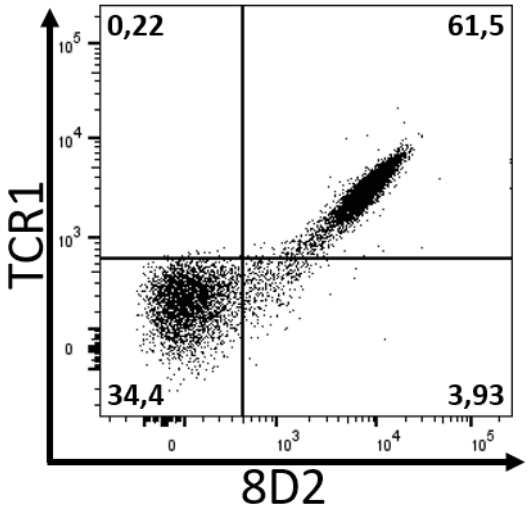
Supplementary Figure 2



Suppl. Fig. 2: Map of the plasmid used to express the chicken γδ TCR complex.

The plasmid included the whole TCR/CD3 complex, with the specific TCR under the control of an EF1a Promotor, and an ampicillin and puromycin resistance.

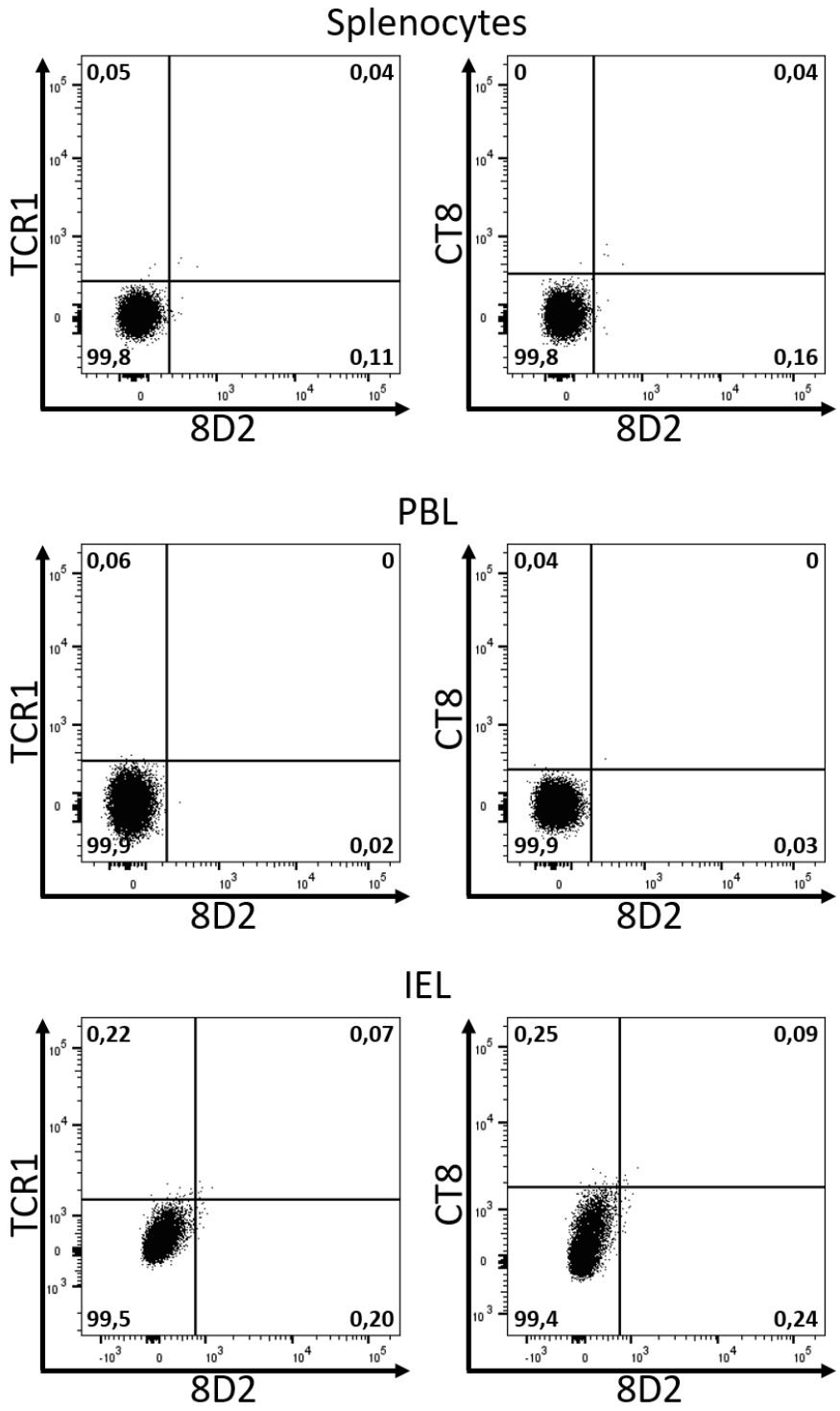
Supplementary Figure 3



Suppl. Fig. 3: Double staining of the γδ T cell line D4 with mAb TCR1 and 8D2.

Flow cytometry staining of the γδ T cell line D4 with TCR1 and 8D2 mAb after 7 days in culture. Live single cells are shown with the percentage of cells indicated.

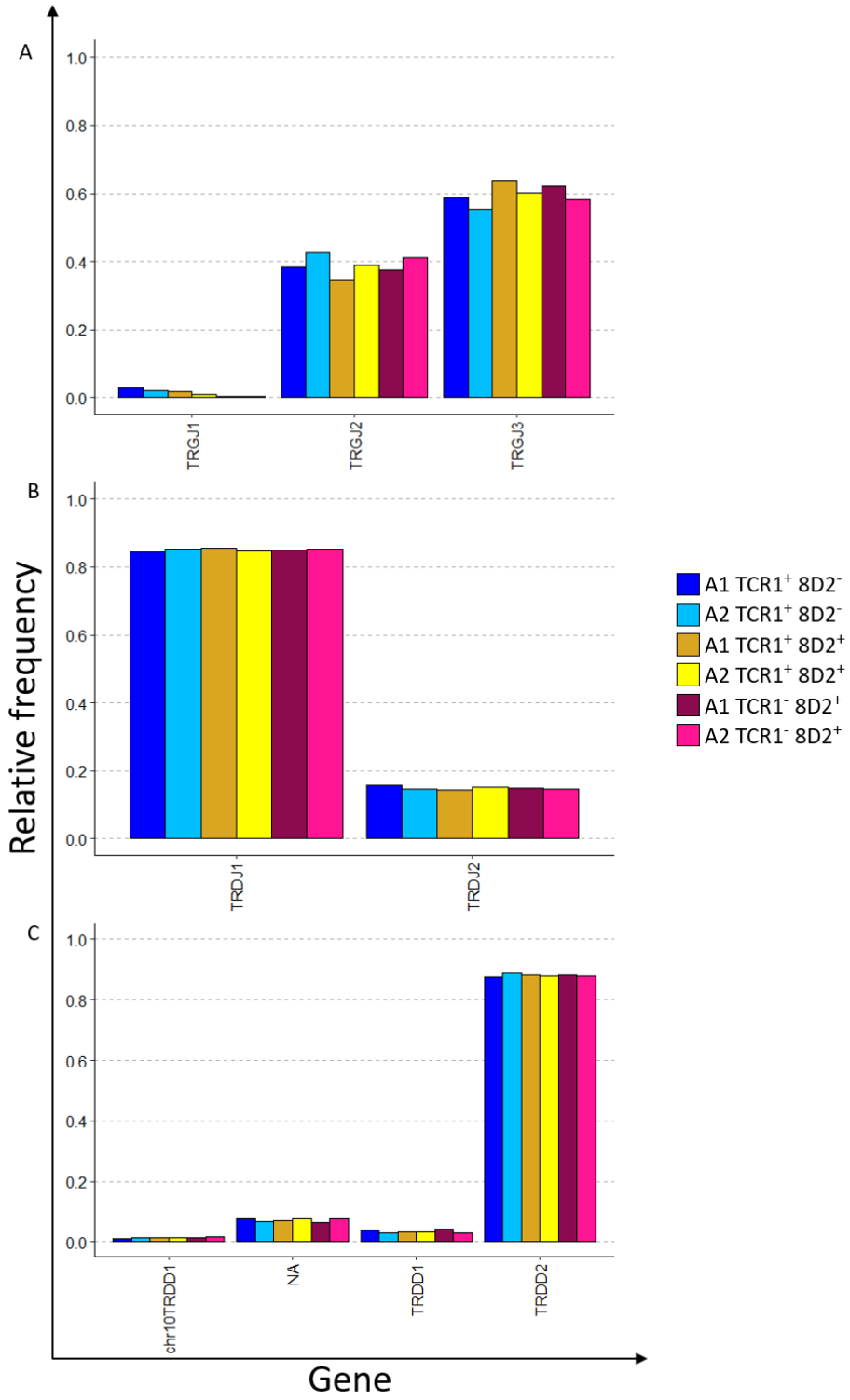
Supplementary Figure 4



Suppl. Fig. 4: Negative controls for flow cytometry analysis.

Negative controls for the flow cytometry stainings of primary chicken cells with anti-TCRγδ (clone TCR1), anti-CD8 (clone CT8) and the mAb 8D2. The percentages of live single $CD3^+$ cells (splenocytes and PBL, top and middle panel), or of live single $CD45^+CD3^+$ cells (IEL, bottom panel) are indicated.

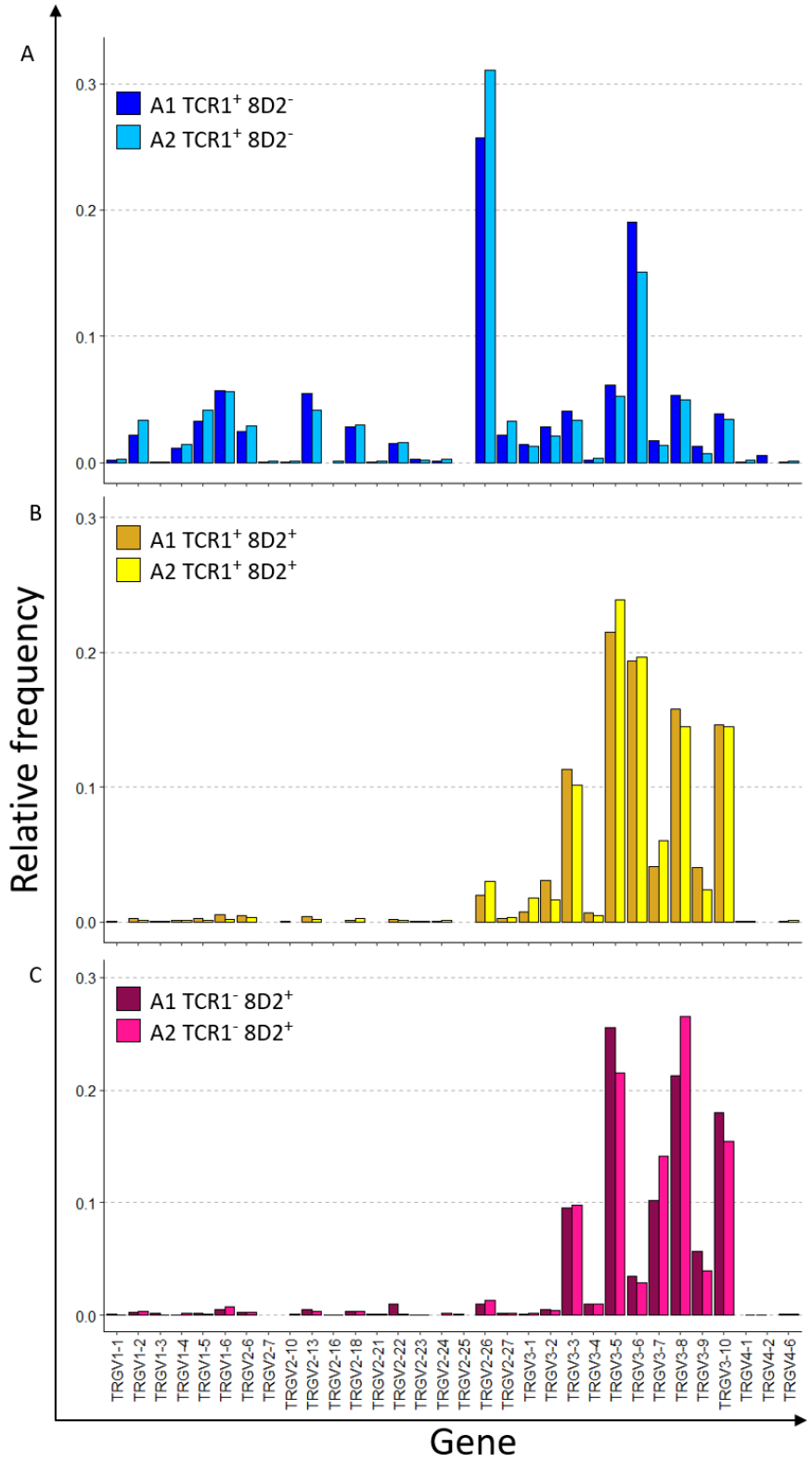
Supplementary Figure 5



Suppl. Fig. 5: Gene frequencies of Jγ, Jδ and Dδ genes expressed in γδ T cell subsets of two chickens (A1, A2).

(A) Frequencies of the different Jγ genes expressed in sorted TCR1^{+}8D2^{-}, TCR1^{+}8D2^{+} and TCR1^{-} 8D2^{+} cells. (B) Frequencies of the different Jδ genes expressed in sorted TCR1^{+}8D2^{-}, TCR1^{+}8D2^{+} and TCR1^{-}8D2^{+} cells. (C) Frequencies of the different Dδ genes expressed in sorted TCR1^{+}8D2^{-}, TCR1^{+}8D2^{+} and TCR1^{-}8D2^{+} cells. NA = no D gene detected.

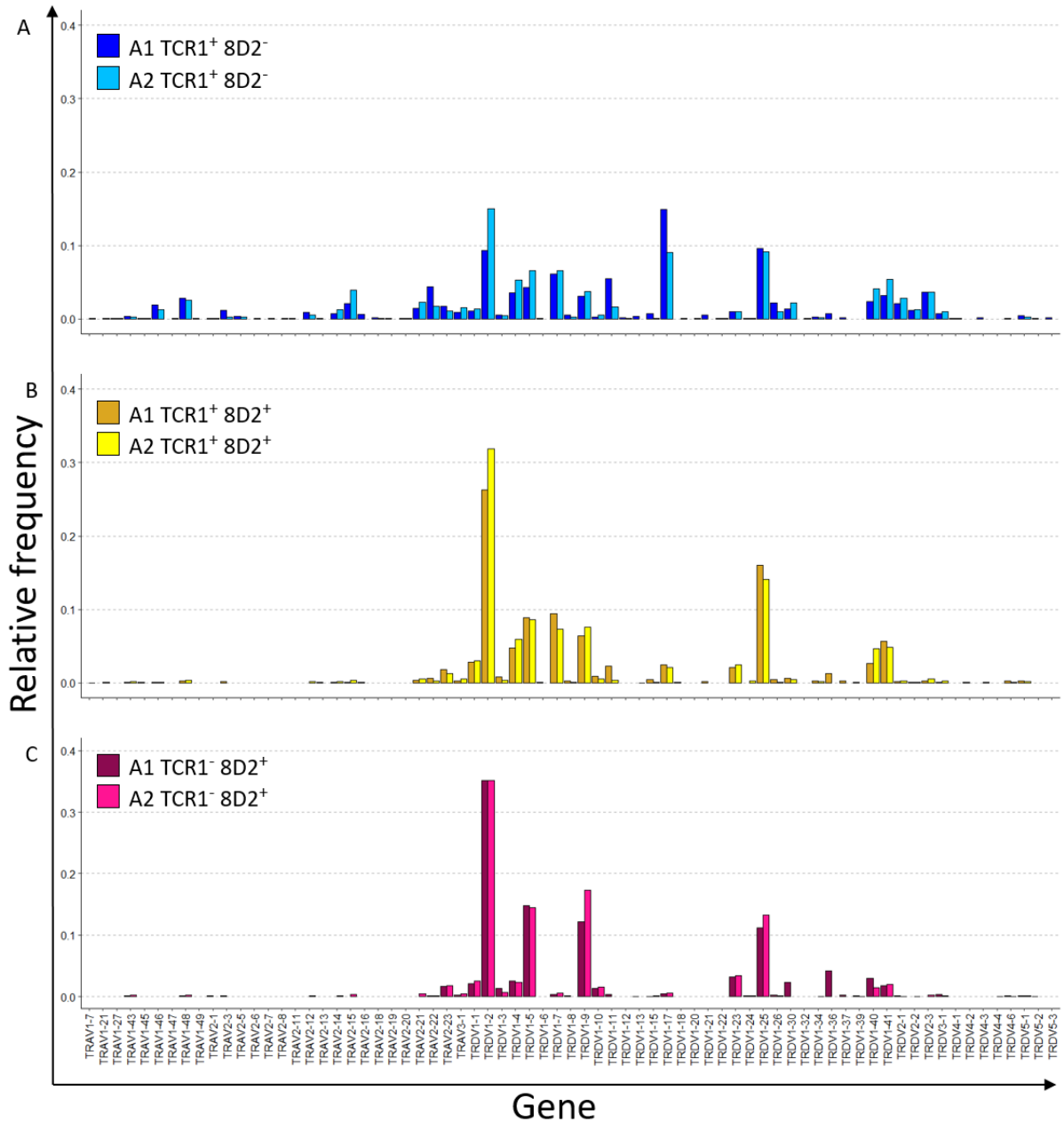
Supplementary Figure 6



Suppl. Fig. 6: Frequencies of Vγ genes expressed in sorted γδ T cell subsets from two chickens (A1, A2).

Frequencies of the different Vγ genes expressed in (A) TCR1^{+}8D2^{-} cells, (B) TCR1^{+}8D2^{+} cells and (C) TCR1^{-}8D2^{+} cells.

Supplementary Figure 7



Suppl. Fig. 7: Frequencies of Vδ genes expressed in sorted γδ T cell subsets from two chickens (A1, A2).

Frequencies of the different Vδ genes expressed in (A) TCR1^{+}8D2^{-} cells, (B) TCR1^{+}8D2^{+} cells and (C) TCR1^{-}8D2^{+} cells.

Supplementary Table 1: Antibody clones and dilutions used for flow cytometry.

Marker	**Clone**	**Fluorochrome**	**Vendor**	**#Cat**	**Dilution**
Viability		eFluor506	eBioscience	65-0866-18	1:1000
Viability		eFluor780	eBioscience	65-0865-14	1:1000
	8D2	unlabeled	selfmade		1:100
chTCRγδ	TCR1	unlabeled	SBA	0230-01	1:200
chTCRγδ	TCR1	FITC	SBA	8230-02	1:200
chTCRγδ	TCR1	PE	SBA	8230-09	1:200
chCD3	CT3	Pacific blue	SBA	8200-26	1:100
chCD8	CT8	PerCP-Cy5.5 (self labeled)	SBA	8220-01	1:1000
chCD45	16-6	unlabeled	selfmade		1:400
msIgG1	gt-anti-msIgG1	APC	SBA	1070-11	1:500
msIgG2a	gt-anti-msIgG2a	FITC	SBA	1080-02	1:400
Normal mouse serum			Jackson	JIM-015-000-120	1:20

6. DISKUSSION

Hühner γδ-T-Zellen wurden bereits im Jahre 1988 erstmals von Sowder *et al.* beschrieben (7). In den letzten Jahrzehnten beschäftigte sich die Forschung allerdings mehr mit αβ-T-Zellen. Ein Grund dafür ist, dass Mensch, Maus und Ratte hauptsächlich diese Art von T-Zellen aufweisen und zu den Spezies gehören, die nur eine geringe Anzahl an γδ-T-Zellen besitzen (5, 6). Hühner (7) zählen jedoch zusammen mit Ziegen (125), Rindern, Schafen (126, 127), Schweinen (128) und auch Kaninchen (129) zu den Spezies mit einer hohen Frequenz an γδ-T-Zellen. Eine hohe γδ-T-Zell-Frequenz ist definiert als eine γδ-T-Zell-Anzahl von über 10% im peripheren Blut. Bei Hühnern können γδ-T-Zellen sogar bis zu 50% der Lymphozyten im peripheren Blut ausmachen (8). Trotzdem ist bisher nur wenig über die Funktion dieser Zellen und auch über die Verteilung der verschiedenen Subpopulationen von γδ-T-Zellen in diesen Tieren bekannt. Dies liegt unter anderem daran, dass derzeit nur ein einziger hühnerspezifischer γδ-T-Zell-Marker (Klon TCR1) vorhanden ist (11). Dieser mAk scheint alle γδ-T-Zellen zu erkennen. Bisher gab es allerdings noch keine mAk, die spezifisch für verschiedene γδ-T-Zell-Untergruppen sind, mit deren Hilfe man diese in den diversen Organen besser charakterisieren und deren Veränderungen während Infektionen untersuchen könnte.

In unserem Labor wurden im Vorfeld Hybridome hergestellt, die neue γδ-T-Zell-spezifische mAk produzieren sollten (225), und zunächst nur die Überstände gescreent. Von einem sehr interessanten mAk, Klon 8D2, wurde anschließend der Überstand aufgereinigt und dieser mAk charakterisiert.

Der neue Klon 8D2 und der schon lange etablierte γδ-T-Zell-Marker TCR1 wurden zunächst in Einzelfärbungen auf der γδ-T-Zelllinie D4 getestet (Drexel *et al.*, Figure 1) (226). Diese Zelllinie ist eine Vγ3-Zelllinie, die in unserem Labor in Anlehnung an die Beschreibung von Marmor *et al.* (227) durch retrovirale Transformation von *in vitro* kultivierten γδ-T-Zellen generiert wurde. Es ist bekannt, dass einige Oberflächenmoleküle einer solchen Zelllinie über längere Zeit aufgrund von genomischer Instabilität *in vitro* verloren gehen können. So wurde auch bei dieser Zelllinie beobachtet, dass die Expression des γδ-TCR im Laufe der Kulturzeit abnahm, mit der Zeit also immer weniger Zellen mit dem mAk TCR1 interagierten. Genauso verhielt es sich mit dem mAk 8D2, auch hier hat die Frequenz der 8D2-positiven Zellen mit der Zeit abgenommen, auch dieses Epitop ging also mit der Zeit verloren. Interessant war aber, dass die Epitope, an die 8D2 und TCR1 binden, zu jedem Zeitpunkt zu einem nahezu gleichen Prozentsatz exprimiert waren. Das spricht dafür, dass entweder die beiden Epitope gemeinsam reguliert werden, oder die beiden mAk an dasselbe Epitop binden. Nachdem jedoch keine Blockierungseffekte bei Doppelfärbungen zu sehen waren, und alle Zellen entweder doppelt positiv oder doppelt negativ waren, kann es sich nicht um dasselbe Epitop

handeln (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 3) (226). Somit ist es wahrscheinlich, dass 8D2 zwar genauso wie der TCR1 den γδ-TCR erkennt, jedoch an einer anderen Stelle. An welches Epitop dieses Rezeptors der TCR1 genau bindet, ist bisher noch nicht bekannt.

Während die Frequenz der TCR1- und 8D2-positiven Zellen der D4-Zelllinie zu allen Zeitpunkten nahezu identisch war, variierten die Prozentzahlen der positiven Zellen bei verschiedenen primären Zelltypen erheblich. Der mAk 8D2 reagierte konsistent nur mit einem Teil der TCR1-positiven Zellen (Drexel *et al.*, Figure 2) (226), was zeigt, dass er im Gegensatz zu TCR1 nicht alle γδ-T-Zellen erfasst.

In Milzleukozyten und IEL des Ileums wurden einige 8D2-positive Zellen nachgewiesen, während von PBL nur wenige Zellen das 8D2-Epitop exprimierten. Neben den zahlreichen TCR1 und 8D2 doppelt positiven Zellen fanden sich in der Milz auch die meisten CD8 und 8D2 doppelt positiven Zellen. Ebenso exprimierte ein Teil der 8D2-positiven Zellen in IEL des Ileums CD8, während in PBL nur eine geringe Anzahl an CD8 und 8D2 doppelt positiven Zellen existierte. CD8 exprimierende γδ-T-Zellen existieren nicht nur im Huhn, diese Art von Zellen wurde auch schon in einigen Geweben von unterschiedlichen Säuger-Spezies beschrieben. So exprimieren etwa 50% der γδ-T-Zellen in der humanen Milz CD8 auf ihrer Oberfläche; bis zu 30% dieses T-Zelltyps wurden im menschlichen Blut als CD8-positiv beschrieben (94). Auch bei Schweinen kann man die γδ-T-Zellen in CD8-positive und CD8-negative Zellen unterteilen (96). Bei Mäusen wurden zudem im intestinalen Epithel CD8-positive γδ-T-Zellen nachgewiesen (95).

Es ist bekannt, dass die Häufigkeit der γδ-T-Zellen bei verschiedenen Tieren abhängig von Alter und Geschlecht erheblich variieren kann (175). Dies war auch in unserer Studie zu sehen, in der sich die Frequenz von TCR1-positiven Zellen zwischen 10% und 50% der Gesamtzellzahl (bei Milzleukozyten und PBL) oder der Gesamtleukozytenzahl (bei IEL) bewegte (Drexel *et al.*, Figure 3) (226). Auch die Frequenz der 8D2-positiven Zellen variierte bei den vier Tieren in allen getesteten Organen (Drexel *et al.*, Figure 3) (226). Vergleicht man aber die Expression der Epitope von TCR1 und 8D2, ist ersichtlich, dass zwischen diesen beiden mAk immer eine positive Korrelation vorlag, was darauf hinweist, dass der 8D2 mAk auch ein Epitop am γδ-TCR erkennt, jedoch ein anderes als der mAk TCR1. Es ist also davon auszugehen, dass 8D2 nur bestimmte γδ-TCR erkennt, die durch spezifische TCRγ- oder TCRδ-Ketten gebildet werden, und dieser mAk somit spezifisch für eine bestimmte Untergruppe von γδ-T-Zellen ist.

Zudem wurden in allen Geweben sehr wenige Zellen als TCR1-negativ, aber 8D2-positiv charakterisiert. Da davon auszugehen ist, dass diese beiden mAk am γδ-TCR binden, würde das bedeuten, dass der mAk TCR1 nicht alle γδ-T-Zellen erkennt. Die Abgrenzungen wurden anhand der Negativkontrolle gesetzt (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 4) (226), und die Fluoreszenzintensität der TCR1-negativen Zellen lag nahe am Schwellenwert. Daher sind wir

überzeugt, dass diese Zellen dennoch als γδ-TCR-positive Zellen betrachtet werden sollten. In diesem Fall wurden die Zellen mit einem TCR1-PE-Direktkonjugat direkt angesprochen, und es könnte sein, dass dieses einige Zellen nicht gut erkennt. Deshalb sollte man den Einsatz des TCR1-PE-Direktkonjugats in Zukunft diesbezüglich kritisch bewerten. Eine aussagekräftigere indirekte Färbung des γδ-TCR mit TCR1 war nicht möglich, denn 8D2 musste indirekt gefärbt werden, weil hierfür bisher noch kein verlässliches Direktkonjugat existiert, und TCR1 und 8D2 IgG1-Isotypen sind. Man sollte vermeiden, zwei gleiche Isotypen in einer Analyse indirekt anzusprechen, da es dabei trotz Blockierens zu unerwünscht falschen Signalen kommen kann.

Um unsere Hypothese zu bestätigen, dass der 8D2 mAk nur mit bestimmten TCRγ- oder TCRδ-Ketten des γδ-TCR reagiert, und um herauszufinden, um welche Ketten es sich hierbei handelt, wurden im Weiteren Sort-Experimente durchgeführt. Dafür wurden Milzzellen von zwei Hühnern basierend auf der Expression der Epitope der beiden mAk TCR1 und 8D2 in drei Populationen gesortet ($TCR1^{+}8D2^{-}$, $TCR1^{+}8D2^{+}$ und $TCR1^{-}8D2^{+}$), und deren V(D)J-Genexpression mithilfe eines kürzlich in unserem Labor entwickelten Protokolls (12) analysiert. Um die verschiedenen γδ-T-Zell-Subpopulationen zu untersuchen, wurde ein Next Generation Sequencing (NGS) der einzelnen DNA-Proben durchgeführt und die FASTQ-Files nach Qualitätskontrolle, Downsampling und Alignment mit Immunarch in R ausgewertet.

Es fiel auf, dass die $TCR1^{+}8D2^{+}$ und $TCR1^{-}8D2^{+}$ Zellen in jeder Hinsicht sehr ähnlich waren, wobei sie sich bezüglich der Vγ-Gene deutlich von den Zellen der dritten Population unterschieden. Während die $TCR1^{+}8D2^{-}$ Zellen Gene jeder der vier Vγ-Familien mit unterschiedlichen Frequenzen exprimierten, waren bei den $TCR1^{+}8D2^{+}$ Zellen hauptsächlich und bei den $TCR1^{-}8D2^{+}$ Zellen nahezu ausschließlich Gene der Vγ3-Familie präsent (Drexel *et al.*, Figure 4, Supplementary Figure 6) (226). Bei den 8D2-positiven Zellen waren die Gene TRGV3-5 und TRGV3-8 am häufigsten vertreten. Auch bei den Vδ-Genen gab es Unterschiede. Während die 8D2-positiven Zellen hauptsächlich TRDV1-2 exprimierten, kamen bei den $TCR1^{+}8D2^{-}$ Zellen neben diesem Gen auch TRDV1-17 und TRDV1-25 relativ häufig vor (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 7) (226). Bezüglich der D- und J-Gene waren sich alle sechs Zellpopulationen sehr ähnlich. Jγ3 war jeweils etwa zu 60% und Jγ2 zu 40% vertreten (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 5A) (226). Dominant waren in allen Zellen mit ungefähr 82% aller Jδ-Gene das Jδ1-Gen (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 5B) (226) und mit ungefähr 90% aller Dδ-Gene das Dδ2-Gen (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 5C) (226). Folgende am häufigsten vorkommende γδ-TCR-Ketten lassen sich für die unterschiedlichen Zell-Populationen zusammenfassen: Für die $TCR1^{-}8D2^{+}$ Zellen TRGV3-8 mit TRGJ3 und TRDV1-2 mit TRDJ1, für die $TCR1^{+}8D2^{+}$ Zellen TRGV3-5 mit TRGJ3 und TRDV1-2 mit TRDJ1, und für die $TCR1^{+}8D2^{-}$ Zellen TRGV2-26 mit TRGJ3 und TRDV1-2 oder TRDV1-17 jeweils mit TRDJ1 (Drexel *et al.*, Figure 5) (226).

Es existieren bisher nur wenige Veröffentlichungen zu TCR-Repertoire-Analysen. Mamedov *et al.* etablierten 2013 ein Protokoll für den Menschen (187), und Migalska *et al.* auf diesem Protokoll basierend für die Rötelmaus (188). Auf Grundlage dieser beiden Publikationen wurden zuletzt in unserem Labor Protokolle für das Huhn bezüglich des Vorbereitens der Proben (34) und des TCR-Profilings erstellt (12), die in dieser Arbeit angewendet wurden.

Mittlerweile gibt es erste Analysen zum γδ-TCR-Repertoire des Huhns (12, 32-34). Zhang *et al.* (33) beschäftigten sich basierend auf den Genomsequenzen des Red Jungle Fowl (GRCG6a) mit dem TCRγ-Repertoire im Thymus. In dieser Studie zeigten die vier untersuchten Hühner einander ähnliche TCRγ-Repertoires. Es wurden mehrere Gene aus verschiedenen Familien häufiger exprimiert, wobei Mitglieder der Vγ3-Familie mit 43,98% des gesamten Vγ-Repertoires dominierten. Gene der Vγ1-Familie waren zu 28,12% und der Vγ2-Familie zu 27,68% vertreten. In unserer Studie wurden in den 8D2-positiven Milzleukozyten ebenfalls hauptsächlich Vγ3-Gene exprimiert, und zwar sogar mit über 90% des gesamten Vγ-Repertoires. In den $TCR1^{+}8D2^{-}$ Zellen machte die Vγ3-Familie wie auch bei Zhang *et al.* (33) im Schnitt 41% des Repertoires aus, allerdings war in unserer Studie die Vγ2-Familie etwa zu 42% und die Vγ1-Familie entsprechend weniger vertreten. Dixon *et al.* (32) untersuchten das TCRγ-Repertoire im Thymus, in der Milz und im Darm und nutzten als Referenz das Genom, das von Liu *et al.* (59) veröffentlicht wurde. Auch hier wurde die TRGV3-Familie als die dominante Familie in allen getesteten Geweben beschrieben. Ein Vertreter dieser Familie, das Gen TRGV3.3, wurde mit etwa 30-40% des gesamten Vγ-Repertoires als das häufigste Gen identifiziert. In unseren Daten hingegen waren in den 8D2-positiven Zellen mehrere Gene der Vγ3-Familie häufig vertreten. Bei den $TCR1^{+}8D2^{-}$ Zellen stach TRGV2-26 mit 25-31% heraus, gefolgt von TRGV3-6 mit 15-19% des gesamten Vγ-Repertoires. Im Vergleich zu unserer Arbeit verwendeten Dixon *et al.* (32) und Zhang *et al.* (33) andere Hühnerlinien und Protokolle zur TCR-Analyse sowie andere Hühnergenomsequenzen, was die Unterschiede zu unseren Ergebnissen erklären könnte.

Unsere Daten wurden mit den gleichen Hühnergenomsequenzen erhoben, die auch Früh *et al.* (12) und Linti *et al.* (34) bereits nutzten. Erstere untersuchten das TCR-Repertoire der gesamten Milz, Linti *et al.* verglichen das TCR-Repertoire von unstimulierten Milzzellen und mit IL-2 und IL-12 stimulierten Milzzellen, wodurch vor allem γδ-T-Zellen proliferieren. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen einige Übereinstimmungen mit diesen beiden Studien: Alle beschreiben TRGJ3 und TRDJ1 als die am häufigsten vorkommenden Jγ- und Jδ-Gene. Bezüglich der Vγ-Gene berichteten Früh *et al.* und Linti *et al.*, dass in unstimulierten Milzzellen vor allem folgende TRGV-Gene genutzt werden: TRGV2-26, TRGV3-5 und TRGV3-6. Mit IL-2 und IL-12 stimulierte Zellen exprimierten vorrangig das Gen TRGV3-5. TRGV2-26 und TRGV3-6 waren auch in unseren Daten die von $TCR1^{+}8D2^{-}$ Zellen am häufigsten exprimierten

Gene. In TCR1$^-$8D2$^+$ Zellen war TRGV3-5 das häufigste Vγ-Gen, zusammen mit TRGV3-8, das auch in den anderen beiden Studien in unterschiedlichen Frequenzen auftrat. Was die Vδ-Gene betrifft, treffen Früh *et al.* und Linti *et al.* verschiedene Aussagen. Während Linti *et al.* TRDV1-2 als das häufigste Gen bezeichneten, gaben Früh *et al.* TRDV1-25 als das dominierende Vδ-Gen an. Diese beiden Gene nehmen auch in den drei verschiedenen Zellpopulationen unserer Studie einen Großteil des Vδ-Repertoires ein. In den TCR1$^+$8D2$^-$ Zellen gehören sie zusammen mit TRDV1-17 zu den meist genutzten Genen. In den 8D2-positiven Zellen ist TRDV1-2 mit 26-35% des Repertoires das mit Abstand am häufigsten exprimierte Gen. TRDV1-25 wird mit 11-16% des Repertoires ebenfalls oft genutzt. Bei den TCR1$^-$8D2$^+$ Zellen sind zusätzlich noch TRDV1-5 und TRDV1-9 zu nennen, die etwa genauso häufig verwendet werden. Die Daten stimmen also bezüglich der Vγ-Gene größtenteils überein, während sich die der am häufigsten genutzten Vδ-Gene unterscheiden. Linti *et al.* (34) zeigten außerdem, dass sich die hauptsächlich exprimierten Vδ-Gene nach Stimulation veränderten, wobei bei jedem Tier ein anderes Gen dominierte.

Anhand der durchgeführten TCR-Repertoire-Analyse lässt sich folglich sagen, dass 8D2-positive Zellen nahezu ausschließlich Gene der Vγ3-Familie exprimieren, während das Vδ-Repertoire nicht sehr eingeschränkt zu sein scheint. Um das zu belegen, wurde eine stabile Vγ3-Zelllinie generiert, die einen spezifischen γδ-TCR exprimiert, der die in TCR1$^-$8D2$^+$ Zellen vorrangig genutzten VγJγ- und VδDδJδ-Gene enthält (Drexel *et al.*, Supplementary Figure 2) (226). Hierfür wurde der pSBbi-GP-Vektor (228) verwendet. Da bekannt ist, dass der TCR nur mithilfe von CD3 an der Oberfläche einer Zelle exprimiert werden kann, wurde zunächst das EGFP-Gen im Vektor durch das Hühner-CD3 ersetzt. Anschließend wurde ein synthetisches Gen, das Vγ3-8 und Jγ3 sowie Vδ1-2, Dδ2 und Jδ1 enthält, in die Klonierungsstelle des Vektors eingefügt. Danach wurde das Plasmid in HEK293-Zellen transfiziert und mit Puromycin selektiert. Nach erfolgreicher Transfektion wurde getestet, ob die mAk CT3, TCR1 und 8D2 mit dieser Vγ3-spezifischen Zelllinie reagierten. Vergleichend wurden TCR1 und 8D2 auch auf einer Vγ1- und einer Vγ2-Zelllinie, die von Fenzl *et al.* (177) etabliert worden sind, getestet. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben folgendes Ergebnis: Der mAk 8D2 reagierte zu 100% mit der Vγ3-TCR exprimierenden Zelllinie (Drexel *et al.*, Figure 6, Figure 7) (226), während er nicht an Vγ1- oder Vγ2-TCR exprimierende Zellen band (Drexel *et al.*, Figure 7) (226). Somit konnte bewiesen werden, dass dieser hühnerspezifische mAk eine Untergruppe von γδ-T-Zellen erkennt, nämlich diejenigen, die eine Vγ3-Kette exprimieren.

Auf dieser Vγ3-spezifischen Zelllinie wurden Doppelfärbungen mit 8D2 und jeweils CT3 oder TCR1 durchgeführt, um hier einen möglichen Zusammenhang in der Expression der Epitope aufzuzeigen. Alle CT3-positiven und TCR1-positiven Zellen wurden auch von 8D2 erfasst. Die Expression von CD3 korreliert klar mit der Expression des Epitops von 8D2, was insofern

schlüssig ist, als bereits gezeigt werden konnte, dass 8D2 wie auch TCR1 an den γδ-TCR bindet, der nur in Kombination mit CD3 an die Oberfläche der Zelle gelangen kann. Bei dieser Zelllinie scheint es zunächst, wie auch bei den primären Organen, TCR1-negative, aber 8D2-positive Zellen zu geben. Allerdings liegt nahe, dass das durch die Verwendung des TCR1-FITC-Direktkonjugats vorgetäuscht wird, wie wir es bereits bei dem TCR1-PE-Direktkonjugat im Zusammenhang mit den primären Organen vermutet haben (vgl. Seite 51/52). Wir gehen davon aus, dass auch hier eigentlich alle Zellen doppelt positiv sind, jedoch γδ-TCR low exprimierende Zellen weniger gut von dem TCR1-FITC-Direktkonjugat erkannt werden als γδ-TCR high exprimierende Zellen. Wie bereits erläutert, muss in Kombination mit 8D2 der TCR1 mAk direkt gefärbt werden, weil beide IgG1-Isotypen sind, und es sonst trotz Blockierens zu falschen AK-Fluorochrom-Verbindungen kommen kann. Auch wenn das TCR1-Direktkonjugat in diesem Zusammenhang nicht optimal zu sein scheint, ist die Verwendung ausreichend, um die Aussage treffen zu können, dass die Expressionen der 8D2- und TCR1-Epitope auf dieser Zelllinie positiv korreliert sind, was bei den primären Zellen schon ersichtlich war. Der Beweis, dass die fälschliche Annahme, es seien nicht alle Zellen TCR1-positiv, tatsächlich nur dem TCR1-Direktkonjugat geschuldet war, ließ sich durch eine Einfachfärbung mit einem APC-markierten sekundären Antikörper erbringen. Diese indirekte Färbung zeigte, dass nahezu alle Zellen dieser Vγ3 Zelllinie TCR1-positiv sind (Drexel *et al.*, Figure 7) (226). Somit lässt sich schlussfolgern, dass Färbungen mit dem TCR1-FITC-Direktkonjugat mit Vorsicht zu beurteilen sind, da dieses eventuell nicht alle γδ-T-Zellen erkennt.

Auch bei den Vγ1- und Vγ2-spezifischen Zelllinien wurden die durchflusszytometrischen Analysen mit indirekten Färbungen durchgeführt: Beide mAk, 8D2 und TCR1, wurden einzeln mit dem gleichen Fluorochrom angefärbt. Hier war das möglich, weil nicht die Koexpression der Epitope interessierte, sondern lediglich, ob die jeweiligen mAk diese Zellen erkennen. Da beide gezeigten Zelllinien γδ-T-Zelllinien sind, würde man erwarten, dass alle Zellen TCR1-positiv sind, wie es bei der Vγ3 Zelllinie der Fall ist. Bei den anderen beiden Zelllinien wird der γδ-TCR jedoch nur etwa auf 26-28% der Zellen exprimiert (Drexel *et al.*, Figure 7) (226). Dies könnte daran liegen, dass der Rezeptor trotz erfolgter Selektion nicht gut exprimiert wird. Trotzdem genügt diese Färbung, um die Aussage zu treffen, dass 8D2 nicht mit Vγ1- oder Vγ2-TCR exprimierenden Zellen reagiert, während TCR1 das bekanntlich macht.

Der Klon TCR1, der für die Erhebung dieser Daten unentbehrlich war, ist bisher der einzige Marker für γδ-T-Zellen des Huhns. Antikörper, die die gesamte γδ-T-Zell-Population erkennen, gibt es auch für andere Spezies; es existieren beispielsweise der Klon 5A6.E9 für den Menschen (207) und der Klon UC7-13D5 für die Maus (214). Für Hühner gab es bisher keine Vγ- oder Vδ-TCR-spezifischen mAk, und somit konnten auch noch keine spezifischen Subpopulationen

eingehend untersucht werden. Für Mensch und Maus existieren hingegen bereits viele mAk für verschiedene Subpopulationen, von denen einige in Tabelle 2 aufgelistet sind. Es wurden unter anderen ein humaner Vγ9-spezifischer mAk (Klon anti-TiγA) (210), ein Vδ1-spezifischer mAk (Klon A13) und ein Vδ2-spezifischer mAk (Klon anti-TiVδ2) (208, 209) charakterisiert. Dabei ist zu beachten, dass Vγ9 von manchen Autoren auch als Vγ2 bezeichnet wird, wie zum Beispiel von Yang *et al.* (229). Für die Maus wurden beispielsweise bisher ein Vγ5-spezifischer mAk (Klon 536) (215) und ein Vγ6-spezifischer mAk (Klon 1C10-1F7) (216) charakterisiert. Mit Hilfe dieser mAk konnte auch die Verteilung der jeweiligen γδ-T-Zell-Untergruppen bei Mensch und Maus bereits erforscht werden. So exprimieren humane γδ-T-Zellen in verschiedenen Geweben eher einen Vδ1-spezifischen TCR, während Zellen im peripheren Blut vorrangig einen Vδ2-spezifischen TCR exprimieren (230), meist in Kombination mit einer Vγ9-Kette (135). γδ-T-Zellen in der Haut von Mäusen exprimieren vor allem einen TCR mit Vγ5- und Vδ1-Ketten (231), während sich im Darmepithel eher $V\gamma7^+$ γδ-T-Zellen befinden, und im Epithel von Uterus, Vagina und Zunge der γδ-TCR überwiegend Vγ6- und Vδ1-Ketten enthält (112). Für Mensch und Maus gibt es folglich einige Antikörper für diverse Subpopulationen von γδ-T-Zellen; die Verteilung dieser Subpopulationen konnte daher bereits untersucht werden. Das macht erneut deutlich, dass derartige Antikörper auch für das Huhn notwendig sind, um die verschiedenen γδ-T-Zell-Populationen besser charakterisieren zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser Arbeit der erste Vγ-spezifische mAk für das Haushuhn beschrieben wird. Dieser mAk 8D2 erkennt eine Subpopulation von γδ-T-Zellen, die einen TCR mit Vγ3-Genen exprimiert. Dieser mAk kann nun für weiterführende Forschungsarbeiten genutzt werden, um beispielsweise die Verteilung dieser spezifischen Untergruppe von γδ-T-Zellen in weiteren Geweben zu untersuchen, und um bei Infektionsversuchen eine potentielle Veränderung dieser Subpopulation während Infektionen zu erkennen. Dieser neue mAk hat sich in der Durchflusszytometrie bei Oberflächenfärbungen bereits gut bewährt, ob er auch bei anderen Techniken eingesetzt werden kann, muss noch untersucht werden. Vorläufige Daten zeigen jedoch bereits, dass er wahrscheinlich in der Immunhistochemie sowie in Kombination mit intrazellulären Färbungen verwendet werden kann.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung eines Vγ3-spezifischen γδ-T-Zell-Markers des Haushuhns

Nachdem Haushühner im Gegensatz zu Mensch und Maus eine hohe Frequenz an γδ-T-Zellen in verschiedenen Geweben aufweisen, geht man davon aus, dass diese Zellen eine wichtige Rolle im Immunsystem der Hühner spielen. Allerdings sind γδ-T-Zellen bisher unzureichend charakterisiert, was unter anderem daran liegt, dass aktuell nur ein hühnerspezifischer Marker für diese Zellen verfügbar ist, der Klon TCR1, der alle γδ-T-Zellen erkennt.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung neuer Marker gegen γδ-T-Zell-Oberflächenantigene, die zur weiteren Charakterisierung von diesen Zellen bei Hühnern verwendet werden können. Hierfür wurden in unserem Labor durch die Immunisierung von Mäusen mit *in vitro* kultivierten γδ-T-Zellen neue monoklonale Antikörper generiert (225).

Potentielle γδ-T-Zell-Marker wurden zunächst mittels Durchflusszytometrie gescreent. Ein monoklonaler Antikörper, Klon 8D2, zeigte auf der γδ-T-Zelllinie D4 ein ähnliches Färbebild wie der monoklonale Antikörper TCR1, was auf koexprimierte Antigene hindeutete. Um dies auf primären Zellen zu verifizieren, wurde die Expression der Epitope für diese beiden monoklonalen Antikörper auf verschiedenen primären Zellen analysiert. Zellsuspensionen von Milzleukozyten, peripheren Blutlymphozyten und intraepithelialen Lymphozyten aus dem Ileum von vier Tieren verschiedenen Alters und Geschlechts wurden hierfür gewonnen und untersucht. Die Frequenz von TCR1-positiven Zellen variierte je nach Tier und Organ zwischen 10% und 50% der Gesamtzellzahl (Milzleukozyten und periphere Blutlymphozyten) bzw. der Gesamtleukozytenzahl (intraepitheliale Lymphozyten). 8D2-positive Zellen waren in allen Organen in einem geringeren Umfang vertreten. Die meisten 8D2-positiven Zellen wurden, bezogen auf die Gesamtzellzahl, zu 10-30% in Milzleukozyten und, bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl, zu 10-38% in intraepithelialen Lymphozyten des Ileums gefunden. In peripheren Blutlymphozyten waren sie in geringerer Frequenz vertreten. In allen drei Zellarten war auffällig, dass der monoklonale Antikörper 8D2 nur einen Teil der TCR1-positiven Zellen erkennt, und dass die Expressionen des 8D2-Epitops und der γδ-TCR positiv korreliert sind. Tiere mit einer höheren Frequenz von TCR1-positiven Zellen wiesen auch eine erhöhte Frequenz von 8D2-positiven Zellen auf und umgekehrt.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass 8D2 ein Epitop am TCR erkennt, das durch spezifische TCRγ- oder TCRδ-Ketten gebildet wird, wurden Milzzellen von zwei Hühnern anhand ihrer TCR1- und 8D2-Expression in drei Populationen gesortet: $TCR1^{+}8D2^{-}$, $TCR1^{+}8D2^{+}$ und $TCR1^{-}8D2^{+}$. Die Subpopulationen wurden dann auf V(D)J-Genexpression mittels TCR-Repertoire-Analysen unter Verwendung eines kürzlich in unserem Labor etablierten Protokolls

analysiert (12). Während die Vγ-Gene der 8D2-negativen Zellen eher variabel waren, exprimierten 8D2-positive Zellen bevorzugt Gene der Vγ3-Familie. Der γδ-TCR in $8D2^{+}TCR1^{-}$ Zellen war am häufigsten zusammengesetzt aus den VγJγ-Genen TRGV3-8 und TRGJ3, sowie aus den VδDδJδ-Genen TRDV1-2, TRDD2 und TRDJ1.

Abschließend wurde eine Vγ3 γδ-TCR exprimierende Zelllinie generiert, indem Hühner-CD3 und der oben genannte spezifische T-Zell-Rezeptor in einem modifizierten pSBbi-GP Vektor (228) in HEK293 Zellen transfiziert wurden. Die Zellen dieser stabilen Zelllinie waren zu 100% positiv für 8D2, während Vγ1- oder Vγ2-TCR (177) exprimierende HEK293-Zellen nicht mit dem monoklonalen Antikörper 8D2 reagierten.

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass der monoklonale Antikörper 8D2 der erste spezifische Hühnerantikörper für Vγ3 γδ-TCR exprimierende T-Zellen ist. Dieser Marker kann nun verwendet werden, um diese Subpopulation weiter zu charakterisieren.

8. SUMMARY

Characterization of a chicken Vγ3-specific γδ T cell marker

Chickens exhibit a high frequency of γδ T cells across various tissues, while humans and mice belong to the species with only few γδ T cells in the peripheral blood. Due to their high prevalence, it is generally assumed that chicken γδ T cells play a crucial role in immune responses. However, γδ T cells have not yet been well characterized in chickens, largely due to the limited availability of specific reagents for their characterization. Up until now, only one chicken-specific monoclonal antibody for these cells is available: the clone TCR1, which recognizes all γδ T cells.

The aim of this study was to establish new markers against γδ T cell surface antigens that could be used for further characterization of these cells in chickens. To achieve this, new monoclonal antibodies were previously generated in our laboratory by immunizing mice with *in vitro* cultured γδ T cells (225).

An initial flow cytometric screening identified a novel monoclonal antibody, clone 8D2, which exhibited an interesting staining pattern, similar to that of monoclonal antibody TCR1 on the γδ T cell line D4, indicative of co-expresses antigens. This prompted further investigation of the expression of the epitopes recognized by these two antibodies (8D2 and TCR1) across several primary cells. Cell suspensions from splenocytes, peripheral blood lymphocytes, and intraepithelial lymphocytes from the ileum of four animals of varying age and sex were analyzed. The frequency of $TCR1^+$ cells varied in different animals and organs and ranged from 10% to 50% of the total cell population (splenocytes and peripheral blood lymphocytes) or of total leukocytes (intraepithelial lymphocytes). $8D2^+$ cells were present in lower numbers across all organs. The highest frequencies of $8D2^+$ cells were found in the spleen, representing 10-30% of the splenocytes, and in intraepithelial lymphocytes of the ileum, comprising 10-38% of the leukocyte population. In peripheral blood lymphocytes, their frequency was notably lower. In all three cell types, 8D2 consistently identified only a subset of $TCR1^+$ cells, but the expression of the epitopes of 8D2 and TCR1 was positively correlated. Accordingly, animals with a higher frequency of $TCR1^+$ cells also showed an increased frequency of $8D2^+$ cells, and vice versa.

To confirm the hypothesis that 8D2 recognizes an epitope on the TCR formed by specific TCRγ or TCRδ chains, splenocytes from two chickens were sorted into three populations based on their TCR1 and 8D2 expression: $TCR1^+8D2^-$, $TCR1^+8D2^+$, and $TCR1^-8D2^+$. These subpopulations were then analyzed for their V(D)J gene usage by T cell receptor profiling, following a recently

established protocol (12). While the Vγ genes in 8D2$^-$ cells were more diverse, 8D2$^+$ cells predominantly expressed Vγ3 genes. γδ TCR in 8D2$^+$ cells most frequently comprised VγJγ genes TRGV3-8 and TRGJ3, as well as VδDδJδ genes TRDV1-2, TRDD2, and TRDJ1.

Finally, a Vγ3 γδ TCR-expressing cell line was generated to confirm binding of 8D2 to this specific γδ TCR. For this purpose, chicken CD3, the aforementioned specific t cell receptor, and a modified pSBbi-GP vector (228) were expressed in HEK293 cells. The cells of this cell line were 100% positive for 8D2. In contrast, HEK293 cells expressing Vγ1 or Vγ2 TCR (177) did not show any reactivity with this monoclonal antibody.

From these data, it can be concluded that the monoclonal antibody 8D2 represents a novel reagent for specifically identifying the chicken Vγ3 γδ TCR. This marker can now be used to further characterize this subpopulation.

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. 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.

3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 1983;302(5909):575-81. doi:10.1038/302575a0.

4. Schatz DG, Swanson PC. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. Annu Rev Genet. 2011;45:167-202. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132552.

5. Hayday AC. γδ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. Annu Rev Immunol. 2000;18:975-1026. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.975.

6. Shekhar S, Milling S, Yang X. Migration of γδ T cells in steady-state conditions. Vet Immunol Immunopathol. 2012;147(1-2):1-5. doi:10.1016/j.vetimm.2012.03.016.

7. 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.

8. Cihak J, Lösch U, Hoffmann-Fezer G, Chen CH, Cooper MD, Ziegler-Heitbrock HW. In vivo depletion of chicken T-cell subsets. Scand J Immunol. 1993;38(2):123-9. doi:10.1111/j.1365-3083.1993.tb01702.x.

9. 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.

10. Silverstein AM. The lymphocyte in immunology: from James B. Murphy to James L. Gowans. Nat Immunol. 2001;2(7):569-71. doi:10.1038/89706.

11. 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.

12. Früh SP, Früh MA, Kaufer BB, Göbel TW. Unraveling the chicken T cell repertoire with enhanced genome annotation. Front Immunol. 2024;15:1359169. doi:10.3389/fimmu.2024.1359169.

13. 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.

14. Murphy JB. STUDIES IN TISSUE SPECIFICITY : II. THE ULTIMATE FATE OF MAMMALIAN TISSUE IMPLANTED IN THE CHICK EMBRYO. J Exp Med. 1914;19(2):181-6. doi:10.1084/jem.19.2.181.

15. Murphy JB. FACTORS OF RESISTANCE TO HETEROPLASTIC TISSUE-GRAFTING : STUDIES IN TISSUE SPECIFICITY. III. J Exp Med. 1914;19(5):513-22. doi:10.1084/jem.19.5.513.

16. Simonsen M. The impact on the developing embryo and newborn animal of adult homologous cells. Acta Pathol Microbiol Scand. 1957;40(6):480-500.

17. Gowans JL. The life-history of lymphocytes. Br Med Bull. 1959;15(1):50-3. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a069715.

18. Simonsen M. Graft-versus-host-reactions: the history that never was, and the way things happened to happen. Immunol Rev. 1985;88:5-23. doi:10.1111/j.1600-065x.1985.tb01151.x.

19. Burnet FM, Holmes MC. Immunological function of thymus and bursa of Fabricius. Thymus lesions in an auto-immune disease of mice. Nature. 1962;194:146-7. doi:10.1038/194146a0.

20. 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;40:373-87. doi:10.1038/icb.1962.42.

21. Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, South MA, Good RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. J Exp Med. 1966;123(1):75-102. doi:10.1084/jem.123.1.75.

22. Glick B, Chang TS, Jaap RG. The Bursa of Fabricius and Antibody Production. Poultry Sci. 1956;35(1):224-5. doi:DOI 10.3382/ps.0350224.

23. Davison TF. The immunologists' debt to the chicken. Br Poult Sci. 2003;44(1):6-21. doi:10.1080/0007166031000085364.

24. Cooper MD, Peterson RD, Good RA. DELINEATION OF THE THYMIC AND BURSAL LYMPHOID SYSTEMS IN THE CHICKEN. Nature. 1965;205:143-6. doi:10.1038/205143a0.

25. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. Nat Rev Immunol. 2006;6(2):107-16. doi:10.1038/nri1780.

26. 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 [Mass] : Re-printed for Dr Samuel Cooley, by Ashley & Brewer, 1802.

27. Pasteur L. De l'atténuation du choléra des poules. Recueil de Médecine Vétérinaire. 1880:1083-90. doi:10.3406/rmv.1880.4289.

28. Churchill AE, Payne LN, Chubb RC. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. Nature. 1969;221(5182):744-7. doi:10.1038/221744a0.

29. Sharma JM, Burmester BR. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. Avian Dis. 1982;26(1):134-49.

30. Sharma JM, Witter RL. Embryo vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2 and 3 vaccines administered singly or in combination. Avian Dis. 1983;27(2):453-63.

31. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature. 2004;432(7018):695-716. doi:10.1038/nature03154.

32. Dixon R, Preston SG, Dascalu S, Flammer PG, Fiddaman SR, McLoughlin K, et al. Repertoire analysis of γδ 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.

33. Zhang T, Li Q, Li X, Kang L, Jiang Y, Sun Y. Characterization of the chicken T cell receptor γ repertoire by high-throughput sequencing. BMC Genomics. 2021;22(1):683. doi:10.1186/s12864-021-07975-7.

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

35. von Heyl T, Klinger R, Aumann D, Zenner C, Alhussien M, Schlickenrieder A, et al. Loss of αβ but not γδ T cells in chickens causes a severe phenotype. Eur J Immunol. 2023;53(12):e2350503. doi:10.1002/eji.202350503.

36. O'Farrelly C, Doherty DG. A Short Primer on Fundamental Immunology. In: Liver Immunology. Gershwin ME, Vierling, J.M., Manns, M.P., editor. 2007.

37. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. 9. Auflage: Springer Spektrum; 2018.

38. 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.

39. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. N Engl J Med. 2000;343(1):37-49. doi:10.1056/nejm200007063430107.

40. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001;357(9270):1777-89. doi:10.1016/s0140-6736(00)04904-7.

41. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

42. Chaplin DD. 1. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(2 Suppl):S442-59. doi:10.1067/mai.2003.125.

43. Avian Immunology. Kaspers B, Schat KA, Göbel TW, Vervelde L, editors. 3. Auflage: Academic Press; 2022.

44. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. Annu Rev Immunol. 2021;39:51-76. doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053702.

45. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. B cell biology: an overview. Curr Allergy Asthma Rep. 2014;14(5):434. doi:10.1007/s11882-014-0434-8.

46. Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigens. Lancet. 1975;1(7922):1406-9. doi:10.1016/s0140-6736(75)92610-0.

47. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science. 1996;272(5258):54-60. doi:10.1126/science.272.5258.54.

48. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145-73. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.

49. Laurence A, O'Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men. Nat Immunol. 2007;8(9):903-5. doi:10.1038/ni0907-903.

50. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol. 2008;8(7):523-32. doi:10.1038/nri2343.

51. Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. J Exp Med. 1983;157(4):1149-69. doi:10.1084/jem.157.4.1149.

52. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, et al. Identification of a putative second T-cell receptor. Nature. 1986;322(6075):145-9. doi:10.1038/322145a0.

53. Kappler J, Kubo R, Haskins K, Hannum C, Marrack P, Pigeon M, et al. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides. Cell. 1983;35(1):295-302. doi:10.1016/0092-8674(83)90232-5.

54. Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. Nat Rev Immunol. 2006;6(12):883-94. doi:10.1038/nri1977.

55. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. Science. 1990;248(4962):1517-23. doi:10.1126/science.2360047.

56. Thompson CB. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. Immunity. 1995;3(5):531-9. doi:10.1016/1074-7613(95)90124-8.

57. Yang B, Gathy KN, Coleman MS. T-cell specific avian TdT: characterization of the cDNA and recombinant enzyme. Nucleic Acids Res. 1995;23(11):2041-8. doi:10.1093/nar/23.11.2041.

58. 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):15329-34. doi:10.1073/pnas.93.26.15329.

59. 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.

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

61. Parra ZE, Mitchell K, Dalloul RA, Miller RD. A second TCRδ locus in Galliformes uses antibody-like V domains: insight into the evolution of TCRδ and TCRμ genes in tetrapods. J Immunol. 2012;188(8):3912-9. doi:10.4049/jimmunol.1103521.

62. 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):1461-5. doi:10.1002/j.1460-2075.1985.tb03803.x.

63. 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):1091-9. doi:10.1016/0092-8674(84)90443-4.

64. Collins MK, Goodfellow PN, Dunne MJ, Spurr NK, Solomon E, Owen MJ. A human T-cell antigen receptor beta chain gene maps to chromosome 7. Embo j. 1984;3(10):2347-9. doi:10.1002/j.1460-2075.1984.tb02137.x.

65. de Villartay JP, Hockett RD, Coran D, Korsmeyer SJ, Cohen DI. Deletion of the human T-cell receptor delta-gene by a site-specific recombination. Nature. 1988;335(6186):170-4. doi:10.1038/335170a0.

66. Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliott JF, Davis MM. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. Nature. 1987;327(6124):677-82. doi:10.1038/327677a0.

67. 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):3933-7. doi:10.1073/pnas.85.11.3933.

68. Griesser H, Champagne E, Tkachuk D, Takihara Y, Lalande M, Baillie E, et al. The human T cell receptor alpha-delta locus: a physical map of the variable, joining and constant region genes. Eur J Immunol. 1988;18(4):641-4. doi:10.1002/eji.1830180424.

69. Göbel TW, Chen CL, Lahti J, Kubota T, Kuo CL, Aebersold R, et al. Identification of T-cell receptor alpha-chain genes in the chicken. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(3):1094-8. doi:10.1073/pnas.91.3.1094.

70. Kubota T, Wang J, Göbel TW, Hockett RD, Cooper MD, Chen CH. Characterization of an avian (Gallus gallus domesticus) TCR alpha delta gene locus. J Immunol. 1999;163(7):3858-66. doi:10.4049/jimmunol.163.7.3858.

71. Weiss A, Stobo JD. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. J Exp Med. 1984;160(5):1284-99. doi:10.1084/jem.160.5.1284.

72. 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;72:103-48. doi:10.1016/s0065-2776(08)60018-8.

73. Sun ZJ, Kim KS, Wagner G, Reinherz EL. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. Cell. 2001;105(7):913-23. doi:10.1016/s0092-8674(01)00395-6.

74. Borst J, Alexander S, Elder J, Terhorst C. The T3 complex on human T lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. J Biol Chem. 1983;258(8):5135-41.

75. Malissen B. An evolutionary and structural perspective on T cell antigen receptor function. Immunol Rev. 2003;191:7-27. doi:10.1034/j.1600-065x.2003.00016.x.

76. Dave VP, Cao Z, Browne C, Alarcon B, Fernandez-Miguel G, Lafaille J, et al. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. Embo j. 1997;16(6):1360-70. doi:10.1093/emboj/16.6.1360.

77. Hayes SM, Love PE. Stoichiometry of the murine gammadelta T cell receptor. J Exp Med. 2006;203(1):47-52. doi:10.1084/jem.20051886.

78. Qian D, Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction. Curr Opin Cell Biol. 1997;9(2):205-12. doi:10.1016/s0955-0674(97)80064-6.

79. Göbel TW, Fluri M. Identification and analysis of the chicken CD3epsilon gene. Eur J Immunol. 1997;27(1):194-8. doi:10.1002/eji.1830270129.

80. Bernot A, Auffray C. Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(6):2550-4. doi:10.1073/pnas.88.6.2550.

81. Chen CL, Ager LL, Gartland GL, Cooper MD. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. J Exp Med. 1986;164(1):375-80. doi:10.1084/jem.164.1.375.

82. Berry R, Headey SJ, Call MJ, McCluskey J, Tregaskes CA, Kaufman J, et al. Structure of the chicken CD3εδ/γ heterodimer and its assembly with the αβT cell receptor. J Biol Chem. 2014;289(12):8240-51. doi:10.1074/jbc.M113.544965.

83. Göbel TW, Bolliger L. The chicken TCR zeta-chain restores the function of a mouse T cell hybridoma. J Immunol. 1998;160(4):1552-4.

84. Göbel TW, Bolliger L. Evolution of the T cell receptor signal transduction units. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;248:303-20. doi:10.1007/978-3-642-59674-2_14.

85. Göbel TW, Dangy JP. Evidence for a stepwise evolution of the CD3 family. J Immunol. 2000;164(2):879-83. doi:10.4049/jimmunol.164.2.879.

86. Araki K, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. Characterization and expression analysis of CD3varepsilon and CD3gamma/delta in fugu, Takifugu rubripes. Immunogenetics. 2005;57(1-2):158-63. doi:10.1007/s00251-005-0772-8.

87. Alabyev BY, Guselnikov SV, Najakshin AM, Mechetina LV, Taranin AV. CD3epsilon homologues in the chondrostean fish Acipenser ruthenus. Immunogenetics. 2000;51(12):1012-20. doi:10.1007/s002510000236.

88. Dzialo RC, Cooper MD. An amphibian CD3 homologue of the mammalian CD3 gamma and delta genes. Eur J Immunol. 1997;27(7):1640-7. doi:10.1002/eji.1830270708.

89. Krissansen GW, Owen MJ, Verbi W, Crumpton MJ. Primary structure of the T3 gamma subunit of the T3/T cell antigen receptor complex deduced from cDNA sequences: evolution of the T3 gamma and delta subunits. Embo j. 1986;5(8):1799-808. doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04429.x.

90. Chan MM, Chen CL, Ager LL, Cooper MD. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. J Immunol. 1988;140(7):2133-8. doi:10.4049/jimmunol.140.7.2133.

91. Chen CL, Bucy RP, Cooper MD. T cell differentiation in birds. Semin Immunol. 1990;2(1):79-86.

92. 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.

93. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. Front Immunol. 2017;8:292. doi:10.3389/fimmu.2017.00292.

94. Bucy RP, Chen CL, Cooper MD. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. J Immunol. 1989;142(9):3045-9.

95. Goodman T, Lefrançois L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. Nature. 1988;333(6176):855-8. doi:10.1038/333855a0.

96. Kim S, Lim B, Mattoo SU, Oh EY, Jeong CG, Kim WI, et al. Comprehensive Transcriptomic Comparison between Porcine CD8(-) and CD8(+) Gamma Delta T Cells Revealed Distinct Immune Phenotype. Animals (Basel). 2021;11(8). doi:10.3390/ani11082165.

97. 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. J Immunol. 1995;154(9):4485-94.

98. 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.

99. Luhtala M, Lassila O, Toivanen P, Vainio O. A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. Eur J Immunol. 1997;27(1):189-93. doi:10.1002/eji.1830270128.

100. Lefort N, Benne C, Lelièvre JD, Dorival C, Balbo M, Sakano S, et al. Short exposure to Notch ligand Delta-4 is sufficient to induce T-cell differentiation program and to increase the T cell potential of primary human CD34+ cells. Exp Hematol. 2006;34(12):1720-9. doi:10.1016/j.exphem.2006.08.007.

101. García-Peydró M, de Yébenes VG, Toribio ML. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. J Immunol. 2006;177(6):3711-20. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3711.

102. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol. 2003;21:139-76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.

103. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. γδ T cells: first line of defense and beyond. Annu Rev Immunol. 2014;32:121-55. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120216.

104. Livák F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. J Immunol. 1999;162(5):2575-80.

105. Xiong N, Raulet DH. Development and selection of gammadelta T cells. Immunol Rev. 2007;215:15-31. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00478.x.

106. 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.

107. Boehme L, Roels J, Taghon T. Development of γδ T cells in the thymus - A human perspective. Semin Immunol. 2022;61-64:101662. doi:10.1016/j.smim.2022.101662.

108. Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of γδ T cells. Eur J Immunol. 2013;43(8):1988-94. doi:10.1002/eji.201343759.

109. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2002;2(5):336-45. doi:10.1038/nri797.

110. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi 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):837-47. doi:10.1016/0092-8674(88)90139-0.

111. 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.

112. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, et al. Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. Nature. 1990;343(6260):754-7. doi:10.1038/343754a0.

113. Sim GK, Rajaserkar R, Dessing M, Augustin A. Homing and in situ differentiation of resident pulmonary lymphocytes. Int Immunol. 1994;6(9):1287-95. doi:10.1093/intimm/6.9.1287.

114. 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):3076-82.

115. Hayday A, Gibbons D. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. Mucosal Immunol. 2008;1(3):172-4. doi:10.1038/mi.2008.8.

116. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. Nature. 1986;322(6082):836-40. doi:10.1038/322836a0.

117. Garman RD, Doherty PJ, Raulet DH. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. Cell. 1986;45(5):733-42. doi:10.1016/0092-8674(86)90787-7.

118. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. J Immunol. 1996;157(7):2873-82.

119. McVay LD, Jaswal SS, Kennedy C, Hayday A, Carding SR. The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development. J Immunol. 1998;160(12):5851-60.

120. 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 Vγ9Vδ2 T Cells. J Immunol. 2019;203(6):1468-79. doi:10.4049/jimmunol.1900592.

121. Tieppo P, Papadopoulou M, Gatti D, McGovern N, Chan JKY, Gosselin F, et al. The human fetal thymus generates invariant effector γδ T cells. J Exp Med. 2020;217(3). doi:10.1084/jem.20190580.

122. Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. Annu Rev Immunol. 1989;7:175-207. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001135.

123. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. Annu Rev Immunol. 1991;9:679-705. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.003335.

124. 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.

125. 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 Vet Sci. 1998;65(2):145-8. doi:10.1016/s0034-5288(98)90166-7.

126. 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.

127. 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):215-21. doi:10.1038/icb.1989.33.

128. 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.

129. Su C, Jakobsen I, Gu X, Nei M. Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. Immunogenetics. 1999;50(5-6):301-8. doi:10.1007/s002510050606.

130. Lanier LL, Weiss A. Presence of Ti (WT31) negative T lymphocytes in normal blood and thymus. Nature. 1986;324(6094):268-70. doi:10.1038/324268a0.

131. Hein WR, Mackay CR. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. Immunol Today. 1991;12(1):30-4. doi:10.1016/0167-5699(91)90109-7.

132. 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):265-9. doi:10.1002/eji.1830200206.

133. 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.

134. Saalmüller A, Hirt W, Reddehase MJ. Porcine gamma/delta T lymphocyte subsets differing in their propensity to home to lymphoid tissue. Eur J Immunol. 1990;20(10):2343-6. doi:10.1002/eji.1830201026.

135. Fichtner AS, Ravens S, Prinz I. Human γδ TCR Repertoires in Health and Disease. Cells. 2020;9(4). doi:10.3390/cells9040800.

136. Davey MS, Willcox CR, Hunter S, Kasatskaya SA, Remmerswaal EBM, Salim M, et al. The human Vδ2(+) T-cell compartment comprises distinct innate-like Vγ9(+) and adaptive Vγ9(-) subsets. Nat Commun. 2018;9(1):1760. doi:10.1038/s41467-018-04076-0.

137. Morrison WI, Davis WC. Individual antigens of cattle. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4- CD8- T lymphocytes (WC1, WC2). Vet Immunol Immunopathol. 1991;27(1-3):71-6. doi:10.1016/0165-2427(91)90082-n.

138. Carr MM, Howard CJ, Sopp P, Manser JM, Parsons KR. Expression on porcine gamma delta lymphocytes of a phylogenetically conserved surface antigen previously restricted in expression to ruminant gamma delta T lymphocytes. Immunology. 1994;81(1):36-40.

139. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity. 2009;31(2):184-96. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.006.

140. Holderness J, Hedges JF, Ramstead A, Jutila MA. Comparative biology of γδ T cell function in humans, mice, and domestic animals. Annu Rev Anim Biosci. 2013;1:99-124. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103639.

141. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. Nat Rev Immunol. 2013;13(2):88-100. doi:10.1038/nri3384.

142. Borst J, van de Griend RJ, van Oostveen JW, Ang SL, Melief CJ, Seidman JG, et al. A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. Nature. 1987;325(6106):683-8. doi:10.1038/325683a0.

143. Vincent MS, Roessner K, Lynch D, Wilson D, Cooper SM, Tschopp J, et al. Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. J Exp Med. 1996;184(6):2109-17. doi:10.1084/jem.184.6.2109.

144. Alarcon B, De Vries J, Pettey C, Boylston A, Yssel H, Terhorst C, et al. The T-cell receptor gamma chain-CD3 complex: implication in the cytotoxic activity of a CD3+ CD4- CD8- human natural killer clone. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(11):3861-5. doi:10.1073/pnas.84.11.3861.

145. Saito T, Pardoll DM, Fowlkes BJ, Ohno H. A murine thymocyte clone expressing gamma delta T cell receptor mediates natural killer-like cytolytic function and TH1-like lymphokine production. Cell Immunol. 1990;131(2):284-301. doi:10.1016/0008-8749(90)90255-p.

146. Fox A, Meeusen E. Sheep perforin: identification and expression by gammadelta T cells from pregnant sheep uterine epithelium. Vet Immunol Immunopathol. 1999;68(2-4):293-6. doi:10.1016/s0165-2427(99)00028-8.

147. Wang L, Das H, Kamath A, Bukowski JF. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. J Immunol. 2001;167(11):6195-201. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6195.

148. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gammadelta T cells. Eur J Immunol. 2009;39(3):662-6. doi:10.1002/eji.200839120.

149. Seo N, Tokura Y, Takigawa M, Egawa K. Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. J Immunol. 1999;163(1):242-9.

150. Allison TJ, Garboczi DN. Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. Mol Immunol. 2002;38(14):1051-61. doi:10.1016/s0161-5890(02)00034-2.

151. Sireci G, Espinosa E, Di Sano C, Dieli F, Fournié JJ, Salerno A. Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens. Eur J Immunol. 2001;31(5):1628-35. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:5<1628::Aid-immu1628>3.0.Co;2-t.

152. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, et al. Clonal selection in the human Vδ1 T cell repertoire indicates γδ TCR-dependent adaptive immune surveillance. Nat Commun. 2017;8:14760. doi:10.1038/ncomms14760.

153. Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, et al. A role for human skin-resident T cells in wound healing. J Exp Med. 2009;206(4):743-50. doi:10.1084/jem.20081787.

154. Macleod AS, Havran WL. Functions of skin-resident γδ T cells. Cell Mol Life Sci. 2011;68(14):2399-408. doi:10.1007/s00018-011-0702-x.

155. Xu B, Pizarro JC, Holmes MA, McBeth C, Groh V, Spies T, et al. Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(6):2414-9. doi:10.1073/pnas.1015433108.

156. O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Cranfill R, Hall L, Lang J, et al. Recognition of a single hsp-60 epitope by an entire subset of gamma delta T lymphocytes. Immunol Rev. 1991;121:155-70. doi:10.1111/j.1600-065x.1991.tb00827.x.

157. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. J Exp Med. 2003;198(3):433-42. doi:10.1084/jem.20030584.

158. von Lilienfeld-Toal M, Nattermann J, Feldmann G, Sievers E, Frank S, Strehl J, et al. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. Clin Exp Immunol. 2006;144(3):528-33. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03078.x.

159. Jouen-Beades F, Paris E, Dieulois C, Lemeland JF, Barre-Dezelus V, Marret S, et al. In vivo and in vitro activation and expansion of gammadelta T cells during Listeria monocytogenes infection in humans. Infect Immun. 1997;65(10):4267-72. doi:10.1128/iai.65.10.4267-4272.1997.

160. 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):3456-63. doi:10.4049/jimmunol.181.5.3456.

161. Li Z, Zhang C, Zhou Z, Zhang J, Zhang J, Tian Z. Small intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 and T cell receptor γδ are involved in bacterial clearance during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. Infect Immun. 2012;80(2):565-74. doi:10.1128/iai.05078-11.

162. Hedges JF, Buckner DL, Rask KM, Kerns HM, Jackiw LO, Trunkle TC, et al. Mucosal lymphatic-derived gammadelta T cells respond early to experimental Salmonella enterocolitis by increasing expression of IL-2R alpha. Cell Immunol. 2007;246(1):8-16. doi:10.1016/j.cellimm.2007.04.006.

163. 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 Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. J Infect Dis. 2001;184(8):1082-5. doi:10.1086/323600.

164. Welsh MD, Kennedy HE, Smyth AJ, Girvin RM, Andersen P, Pollock JM. Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of Mycobacterium bovis. Infect Immun. 2002;70(11):6114-20. doi:10.1128/iai.70.11.6114-6120.2002.

165. 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):1969-75. doi:10.1084/jem.185.11.1969.

166. Costa G, Loizon S, Guenot M, Mocan I, Halary F, de Saint-Basile G, et al. Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: γδ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. Blood. 2011;118(26):6952-62. doi:10.1182/blood-2011-08-376111.

167. 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):543-57. doi:10.1084/jem.170.2.543.

168. 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):2234-43.

169. 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.

170. 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):3315-22. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07531.x.

171. Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. Blood. 1979;54(6):1203-15.

172. 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):3547-55.

173. 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):977-88. doi:10.1084/jem.186.7.977.

174. 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.

175. 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.

176. Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. Vet Immunol Immunopathol. 2005;104(1-2):117-27. doi:10.1016/j.vetimm.2004.11.003.

177. 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.

178. 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.

179. Matsuyama-Kato A, Iseki H, Boodhoo N, Bavananthasivam J, Alqazlan N, Abdul-Careem MF, et al. Phenotypic characterization of gamma delta (γδ) 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.

180. Pieper J, Methner U, Berndt A. Characterization of avian γδ T-cell subsets after Salmonella enterica serovar Typhimurium infection of chicks. Infect Immun. 2011;79(2):822-9. doi:10.1128/iai.00788-10.

181. 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.

182. Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated Salmonella typhimurium strains. Vet Immunol Immunopathol. 2001;78(2):143-61. doi:10.1016/s0165-2427(00)00264-6.

183. 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.

184. Dalgaard TS, Norup LR, Rubbenstroth D, Wattrang E, Juul-Madsen HR. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution. Vet Immunol Immunopathol. 2010;138(1-2):85-94. doi:10.1016/j.vetimm.2010.07.010.

185. Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. Vet Immunol Immunopathol. 2000;73(3-4):309-21. doi:10.1016/s0165-2427(00)00148-3.

186. Tsuji S, Char D, Bucy RP, Simonsen M, Chen CH, Cooper MD. Gamma delta T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4+ alpha beta T cells. Eur J Immunol. 1996;26(2):420-7. doi:10.1002/eji.1830260223.

187. 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.

188. Migalska M, Sebastian A, Radwan J. Profiling of the TCRβ repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. Sci Rep. 2018;8(1):11613. doi:10.1038/s41598-018-30037-0.

189. 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 γδ T cells. Dev Comp Immunol. 2020;105:103575. doi:10.1016/j.dci.2019.103575.

190. Lefranc MP. IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System. Cold Spring Harb Protoc. 2011;2011(6):595-603. doi:10.1101/pdb.top115.

191. Parra ZE, Miller RD. Comparative analysis of the chicken TCRα/δ locus. Immunogenetics. 2012;64(8):641-5. doi:10.1007/s00251-012-0621-5.

192. Shulman M, Wilde CD, Köhler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature. 1978;276(5685):269-70. doi:10.1038/276269a0.

193. Vacca F, Sala C, Rappuoli R. Monoclonal Antibodies for Bacterial Pathogens: Mechanisms of Action and Engineering Approaches for Enhanced Effector Functions. Biomedicines. 2022;10(9). doi:10.3390/biomedicines10092126.

194. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. Antibodies (Basel). 2020;9(3). doi:10.3390/antib9030034.

195. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256(5517):495-7. doi:10.1038/256495a0.

196. Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur J Immunol. 1976;6(7):511-9. doi:10.1002/eji.1830060713.

197. Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. Immunotherapy. 2011;3(3):371-80. doi:10.2217/imt.11.4.

198. Zhang C. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. Methods Mol Biol. 2012;901:117-35. doi:10.1007/978-1-61779-931-0_7.

199. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. J Genet Eng Biotechnol. 2021;19(1):159. doi:10.1186/s43141-021-00264-6.

200. Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C, et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. Int Immunopharmacol. 2020;85:106639. doi:10.1016/j.intimp.2020.106639.

201. Beverley PC, Callard RE. Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. Eur J Immunol. 1981;11(4):329-34. doi:10.1002/eji.1830110412.

202. Kung P, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science. 1979;206(4416):347-9. doi:10.1126/science.314668.

203. Reinherz EL, Schlossman SF. The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. Pharmacol Rev. 1982;34(1):17-22.

204. Jones M, Cordell JL, Beyers AD, Tse AG, Mason DY. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. J Immunol. 1993;150(12):5429-35.

205. Mitra T, Gerner W, Kidane FA, Wernsdorf P, Hess M, Saalmüller A, et al. Vaccination against histomonosis limits pronounced changes of B cells and T-cell subsets in turkeys and chickens. Vaccine. 2017;35(33):4184-96. doi:10.1016/j.vaccine.2017.06.035.

206. Brenner MB, McLean J, Scheft H, Warnke RA, Jones N, Strominger JL. Characterization and expression of the human alpha beta T cell receptor by using a framework monoclonal antibody. J Immunol. 1987;138(5):1502-9.

207. Band H, Hochstenbach F, McLean J, Hata S, Krangel MS, Brenner MB. Immunochemical proof that a novel rearranging gene encodes the T cell receptor delta subunit. Science. 1987;238(4827):682-4. doi:10.1126/science.3672118.

208. Ferrini S, Prigione I, Bottino C, Ciccone E, Tambussi G, Mammoliti S, et al. Monoclonal antibodies which react with the T cell receptor gamma/delta recognize different subsets of CD3+WT31- T lymphocytes. Eur J Immunol. 1989;19(1):57-61. doi:10.1002/eji.1830190110.

209. Miossec C, Faure F, Ferradini L, Roman-Roman S, Jitsukawa S, Ferrini S, et al. Further analysis of the T cell receptor gamma/delta+ peripheral lymphocyte subset. The V delta 1 gene segment is expressed with either C alpha or C delta. J Exp Med. 1990;171(4):1171-88. doi:10.1084/jem.171.4.1171.

210. Jitsukawa S, Faure F, Lipinski M, Triebel F, Hercend T. A novel subset of human lymphocytes with a T cell receptor-gamma complex. J Exp Med. 1987;166(4):1192-7. doi:10.1084/jem.166.4.1192.

211. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(8):4061-5. doi:10.1073/pnas.76.8.4061.

212. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(5):1374-8. doi:10.1073/pnas.84.5.1374.

213. Kubo RT, Born W, Kappler JW, Marrack P, Pigeon M. Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine alpha beta T cell receptors. J Immunol. 1989;142(8):2736-42.

214. Houlden BA, Matis LA, Cron RQ, Widacki SM, Brown GD, Pampeno C, et al. A TCR gamma delta cell recognizing a novel TL-encoded gene product. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989;54 Pt 1:45-55. doi:10.1101/sqb.1989.054.01.006.

215. Havran WL, Grell S, Duwe G, Kimura J, Wilson A, Kruisbeek AM, et al. Limited diversity of T-cell receptor gamma-chain expression of murine Thy-1+ dendritic epidermal cells revealed by V gamma 3-specific monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(11):4185-9. doi:10.1073/pnas.86.11.4185.

216. Hatano S, Tun X, Noguchi N, Yue D, Yamada H, Sun X, et al. Development of a new monoclonal antibody specific to mouse Vγ6 chain. Life Sci Alliance. 2019;2(3). doi:10.26508/lsa.201900363.

217. Dialynas DP, Quan ZS, Wall KA, Pierres A, Quintáns J, Loken MR, et al. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. J Immunol. 1983;131(5):2445-51.

218. Ledbetter JA, Herzenberg LA. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol Rev. 1979;47:63-90. doi:10.1111/j.1600-065x.1979.tb00289.x.

219. Kirkham PA, Takamatsu H, Yang H, Parkhouse RM. Porcine CD3 epsilon: its characterization, expression and involvement in activation of porcine T lymphocytes. Immunology. 1996;87(4):616-23. doi:10.1046/j.1365-2567.1996.498566.x.

220. Yang H, Oura CA, Kirkham PA, Parkhouse RM. Preparation of monoclonal anti-porcine CD3 antibodies and preliminary characterization of porcine T lymphocytes. Immunology. 1996;88(4):577-85. doi:10.1046/j.1365-2567.1996.d01-682.x.

221. Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. J Immunol. 1984;133(1):368-75.

222. Jonjić S, Koszinowski UH. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine. J Immunol. 1984;133(2):647-52.

223. Lunney JK. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. Immunol Today. 1993;14(4):147-8. doi:10.1016/0167-5699(93)90227-c.

224. Chen CH, Sowder JT, Lahti JM, Cihak J, Lösch U, Cooper MD. TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(7):2351-5. doi:10.1073/pnas.86.7.2351.

225. Huhle D, Hirmer S, Göbel TW. Splenic γδ 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.

226. Drexel VEM, Göbel TW, Früh SP. Characterization of a novel chicken γδ TCR-specific marker. Dev Comp Immunol. 2024;161:105250. doi:10.1016/j.dci.2024.105250.

227. Marmor MD, Benatar T, Ratcliffe MJ. Retroviral transformation in vitro of chicken T cells expressing either alpha/beta or gamma/delta T cell receptors by reticuloendotheliosis virus strain T. J Exp Med. 1993;177(3):647-56. doi:10.1084/jem.177.3.647.

228. Kowarz E, Löscher D, Marschalek R. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. Biotechnol J. 2015;10(4):647-53. doi:10.1002/biot.201400821.

229. Yang R, Yao L, Shen L, Sha W, Modlin RL, Shen H, et al. IL-12 Expands and Differentiates Human Vγ2Vδ2 T Effector Cells Producing Antimicrobial Cytokines and Inhibiting Intracellular Mycobacterial Growth. Front Immunol. 2019;10:913. doi:10.3389/fimmu.2019.00913.

230. Kalyan S, Kabelitz D. Defining the nature of human γδ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. Cell Mol Immunol. 2013;10(1):21-9. doi:10.1038/cmi.2012.44.

231. Tigelaar RE, Lewis JM. Immunobiology of Mouse Dendritic Epidermal T Cells: A Decade Later, Some Answers, But Still More Questions. Journal of Investigative Dermatology. 1995;105(1):S43-S9. doi:10.1038/jid.1995.9.

10. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel, der es mir ermöglichte, diese Promotionsarbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Seine hervorragende fachliche und menschliche Betreuung, seine stetige Unterstützung und sein Vertrauen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch bei Simon Früh (PhD) bedanke ich mich für seine wissenschaftlichen Ratschläge und stetige Hilfsbereitschaft. Seine Geduld, Ermutigungen und die kurzen Pausen mit Hazel haben eine große Rolle während der Erstellung dieser Arbeit gespielt.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an die gesamte AG Immunologie, für die herzliche Aufnahme und die kollegiale Unterstützung in den letzten Jahren. Die Hilfsbereitschaft, der fachliche Austausch und die freundschaftliche Zusammenarbeit waren eine wertvolle Stütze.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie für unseren Zusammenhalt bedanken. Vornweg meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich in jeglicher Situation unterstützen. Flora und Choufriedl danke ich dafür, dass sie immer in meiner Nähe sind und mich jederzeit mit einem Kaffee empfangen, egal ob für ein entspanntes Miteinander oder mit aufbauenden Worten. Bei Lugo bedanke ich mich für seine emotionale und musikalische Unterstützung in den vergangenen Jahren sowie dafür, dass er stets an mich geglaubt hat. Ebenso waren die Spaziergänge und Kuscheleinheiten mit meiner Hündin Laila eine Quelle der Erholung und Motivation.