

Charakterisierung von T-Zellen im lymphatischen und Epithelgewebe durch den Einsatz von TCR KO-Hühnern

Theresa Cornelia Birgita Helene von Heyl zu Herrnsheim

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Martin Klingenspor

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Benjamin Schusser
2. Prof. Dr. Benedikt Kaufer
3. Priv.-Doz. Dr. Angela Berndt

Die Dissertation wurde am 30.08.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 26.10.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURTEIL	2
2.1 Das Immunsystem des Haushuhns	2
2.1.1 Entwicklung, Differenzierung und Funktionen von Hühner T-Zellen	3
2.1.1.1 $\alpha\beta$ T-Zellen in Hühnern, die Hauptakteure der adaptiven Immunantwort	5
2.1.1.2 Die unbekannte Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen	7
2.2 Lymphatische Organe des Haushuhns	8
2.2.1 Aufbau und Funktion des Thymus im Huhn	8
2.2.2 Die Milz als zentrales, sekundäres lymphatisches Organ	9
2.2.3 Reifung der B-Zellen in der Bursa des Fabricius	10
2.2.4 Das darmassoziierte lymphatische Gewebe	11
2.3 Untersuchung der T-Zell-Populationen mittels genetisch veränderter Hühner	12
2.3.1 Erstellung genetisch veränderter Hühner	12
2.3.2 Nutzung von CRISPR/Cas9 zur Erstellung von genetisch veränderten Hühnern	13
2.3.3 TCR KO-Hühner	14
2.3.4 mCherry ⁺ exprimierende Hühner als Reporterlinie für den adoptiven Transfer von T-Zellen	15
2.3.5 Induzierbare KO-Systeme	15
2.4 Aviäre Kokzidose in Hühnern	16
2.5 Adoptive Transfersysteme	19
2.5.1 Der Hauptkompatibilitätskomplex im Huhn	19
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
4 MATERIAL	22
4.1 Geräte und Ausrüstung	22
4.2 Verbrauchsmaterialien	25
4.3 Verwendete Hühnerlinien, Zellen, Bakterien und Erreger	27
4.4 Chemikalien	28
4.4.1 Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze	28
4.4.2 Verwendete Zusätze für die molekularbiologischen Methoden	29
4.4.3 Verwendete Zusätze für die Histologie	31

4.5	Zellkultur-Medien	32
4.5.1	Manipulation-Medium	32
4.5.2	PGC-Medium	32
4.5.3	Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS)	33
4.5.4	Hygromycin B-Stammlösung	33
4.6	Molekularbiologische Puffer	33
4.6.1	PBS-T	33
4.6.2	PBS + 1% Bovines Serum Albumin (BSA)	34
4.6.3	Sucrose-Tris-Magnesiumchlorid (STM) Puffer	34
4.6.4	Tris-EDTA-Natriumchlorid (TEN) Puffer	34
4.6.5	Pronase E-Stammlösung	34
4.6.6	Tissue-Lysis-Buffer	35
4.6.7	10X Trisborat mit EDTA Puffer (TBE)	35
4.6.8	6x Orange G DNA-Loading Dye	35
4.6.9	DNA 1kp plus Ladder	36
4.6.10	Fluobuffer	36
4.6.11	Separation-Buffer	36
4.6.12	Labeling-Buffer	36
4.6.13	Coating-Buffer	37
4.6.14	Tetramethylbenzidin (TMB)-Buffer	37
4.6.15	TMB-Stammlösung	37
4.6.16	TMB-Arbeitslösung	37
4.6.17	4%ige Magermilch	38
4.6.18	1,5% Trypsin-Lösung	38
4.6.19	4% Paraformaldehyd (PFA) -Lösung	38
4.7	Bakterien und Klonierung	38
4.7.1	Luria-Bertani (LB)-Medium	38
4.7.2	LB-Agar	39
4.7.3	Trypton-Soya-Agar	39
4.7.4	Ampicillin-Stammlösung	39
4.8	Enzyme und Polymerasen	40
4.8.1	Enzyme und Puffer	40
4.8.2	Polymerasen	41
4.9	Antikörper	41
4.9.1	FACS-Antikörper	41
4.9.2	Histologie-Antikörper	43
4.9.3	Enzym -Linked Immunosobent Assay (ELISA)-Antikörper	44
4.10	Kits	44
4.11	Primer und Oligonukleotide	45
4.11.1	Primer	45
4.11.2	Oligonukleotide	49
4.12	DNA-Vektoren und-Konstrukte	50
4.13	Software und verwendete Online-Dienste	50
5	METHODEN	52
5.1	Molekularbiologische Methoden	52
5.1.1	gDNA-Gewinnung	52
5.1.1.1	gDNA-Isolierung aus PGCs	52

5.1.1.2	gDNA-Isolierung aus Blut	52
5.1.1.3	gDNA-Isolierung aus Gewebe	53
5.1.1.4	gDNA-Isolierung aus Sperma	53
5.1.2	Isolierung von RNA	53
5.1.2.1	Isolierung von RNA aus PBMCs	53
5.1.2.2	Isolierung von RNA aus Gewebe (Bursa, Thymus, Milz)	54
5.1.3	Messung der Reinheit und Integrität der RNA mittels Bioanalyzer	55
5.1.4	cDNA-Synthese	55
5.1.5	Polymerasekettenreaktionen	56
5.1.5.1	Geschlechtsbestimmung	56
5.1.5.2	Genotyping TCR C β KO-Hühner	57
5.1.5.3	Genotyping TCR C γ KO-Hühner	58
5.1.5.4	MHC-Haplotypisierung	59
5.1.5.5	Cre-Genotypisierung	60
5.1.5.6	loxP TCR C β ^{KI} -Genotypisierung	61
5.1.5.7	Gelelektrophorese	62
5.1.5.8	ddPCR	63
5.1.5.9	qRT-PCR	65
5.1.6	Zellsortierung	66
5.1.6.1	Dichtezentrifugierung	67
5.1.6.2	Oberflächenmarker Färbung	67
5.1.6.3	zytosolische Färbung	68
5.1.6.4	MACS	68
5.1.6.5	Gating-Strategien	70
5.1.7	Histologie	73
5.1.7.1	H&E-Färbung	73
5.1.7.2	Immunhistologie	74
5.1.7.3	Floureszenzhistologie	75
5.1.7.4	Bestimmung der maximalen Invasionstiefe der Shizonten	76
5.1.7.5	Scoring System für Läsionen	77
5.1.8	Bestimmung der Oozytenzahl	77
5.1.9	ELISA	78
5.1.10	CRISPR-Klonierung	79
5.1.11	Transformation in DH5 α -Bakterien	81
5.1.12	Plasmid Isolierung	81
5.1.13	Restriktionsverdau	82
5.1.14	Sequenzierung	83
5.2	Zellkultur	83
5.2.1	Zellzählung	83
5.2.2	Auftauen von PGCs	83
5.2.3	Kultivierung von PGCs	83
5.2.4	Transfektion von PGCs	84
5.2.5	Selektion von PGCs mit Antibiotikum	84
5.2.6	Selektion von PGCs im Zellsorter	84
5.2.7	Kryokonservierung von PGCs	85
5.3	Tiere und Tierhaltung	85
5.3.1	Erstellung von Keimbahn-Chimären	85
5.3.2	Inkubation von Eiern zum Schlupf der Hühner	86
5.3.3	Gewinnung von Sperma-Proben	86
5.3.4	Wiegen der Tiere	87
5.3.5	Blutabnahme	87
5.3.6	Intravenöse Injektion für den adoptiven Transfer	87
5.3.7	Euthanasie zur Organentnahme	87
5.3.8	Ermittlung des Organ/Körpergewicht-Quotientens	88
5.3.9	Bestimmung des Läsionsscores	88
5.3.10	Aerobe und mikroaerophile Kultivierung der Milz	88

5.3.11	<i>In ovo</i> Methoden	89
5.3.11.1	Allantois-Entnahme	89
5.3.11.2	<i>In ovo</i> Blutentnahme/Injektion	89
5.3.12	Experimenteller Ablauf der adoptiven Transferexperimente	90
5.3.13	Experimenteller Ablauf der Infektionsexperimente mit <i>Eimeria tenella</i>	93
6	ERGEBNISSE	95
6.1	TCR Cβ Knockout-Hühner zeigen einen schwerwiegenden Phänotyp	95
6.1.1	Etablierung der TCR C β Knockout-Huhn-Genotypisierung	95
6.1.2	Normale Entwicklung der lymphatischen Organe von TCR C β KO-Embryonen an ED18	96
6.1.3	Ausgeprägte Granulom-Bildung bei TCR C β KO-Tieren zwei Wochen nach Schlupf	98
6.1.4	Fehlende Kompensation des $\alpha\beta$ T-Zell-Verlustes durch $\gamma\delta$ T-Zellen in TCR C β KO-Hühnern	101
6.1.5	Der Phänotyp der TCR C β KO-Hühner beeinflusst die Entwicklung der lymphatischen Organe	104
6.1.6	Der Knockout von $\alpha\beta$ T-Zellen führt zu niedrigen Serum Antikörper Leveln	107
6.1.7	FoxP3-Genexpression ist signifikant niedriger in TCR C β KO-Tieren	108
6.1.8	Frühe T-Zell-Aktivierungsmarkern der $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant niedriger in TCR C β KO-Tieren	111
6.1.9	Ausschluss bakterieller Infektionen als Stimulus für den Phänotyp der TCR C β KO-Tiere	112
6.1.10	Generierung von TCR Doppel-KO-Hühnern	112
6.2	$\gamma\delta$ T-Zellen spielen keine entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen Eimeria-Infektionen	116
6.2.1	Shizonten dringen signifikant weniger tief in die Submukosa von primärinfizierten TCR C γ KO-Tiere ein	116
6.2.2	TCR2 ⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen kompensieren den Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen	119
6.2.3	TCR C γ KO-Tiere zeigen keine Unterschiede zu WT-Hühnern in den Läsionen des Caecums nach Infektion	123
6.3	Erste Erfolge beim Transfer von mCherry⁺ T-Zellen in TCR KO-Hühner	124
6.3.1	Vorkommen von drei MHC-Haplotypen in Spender- und Empfängertiere	124
6.3.2	Vereinzelte mCherry ⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen in TCR C γ KO-Hühner nach adoptiven Transfer	127
6.3.3	Isolierung von mCherry ⁺ - $\alpha\beta$ T-Zellen aus Blut besser für Transfer geeignet	130
6.3.4	mCherry ⁺ Thymozyten wandern nach Transfer in Thymus von TCR C β KO-Embryos	134
6.4	Generierung von CRE ER^{T2}-Chimären und einer loxP TCR Cβ^{KI}-Keimzelllinie	135
6.4.1	Einfügung einer ER ^{T2} -Cre-ER ^{T2} Domäne in PGCs	136
6.4.2	Positive Keimbahntransmission in Cre-ER ^{T2} -Chimären	137
6.4.3	Erstellung eines DNA-Templates zur Integration der loxP-Seiten	140
6.4.4	Erstellung genetisch veränderter loxP TCR C β ^{KI} -PGCs	142
7	DISKUSSION	144
7.1	Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen führt zu ausgeprägtem Phänotyp der TCR Cβ KO-Tiere	144
7.1.1	Die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen im Huhn	149
7.2	$\gamma\delta$ T-Zellen spielen keine essenzielle Rolle in der Infektion mit <i>Eimeria tenella</i>	151
7.3	Herausforderungen bei der Etablierung eines adoptiven Transfersystems im Huhn	153
7.4	Die Erstellung eines induzierbaren KO-Systems im Huhn	155
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	158

9	LITERATURVERZEICHNIS	159
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	169
11	TABELLENVERZEICHNIS	172
12	DANKSAGUNG	174

Zusammenfassung

Hühner (*Gallus gallus domesticus*) sind eine der wichtigsten Nutztierarten weltweit, da sowohl Hühnerfleisch als auch Eier als Eiweißquellen in der menschlichen Ernährung verwendet werden. Hühner sind jedoch vielen potenziellen Krankheitserregern ausgesetzt, welche auch ein enormes Zoonose-Risiko besitzen. Durch ein fundiertes Wissen über das Immunsystem von Hühnern, können diese Krankheiten einfacher bekämpft beziehungsweise vermieden werden. T-Zellen sind eine wichtige Lymphozyten-Population des erworbenen Immunsystems. Die Zellen werden definiert über ihren T-Zell-Rezeptor. Dieser Rezeptor besteht aus jeweils zwei Ketten, die wiederum in eine konstante und in eine variable Region eingeteilt werden. Durch die Zusammensetzung der Ketten werden zwischen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen unterschieden. Unter Verwendung von T-Zell-Knockout-Hühnern, konnte in dieser Arbeit die Rolle der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen im Huhn untersucht werden.

Zunächst wurden TCR C β KO-Hühner phänotypisch beschrieben. Im Alter von circa zwei Wochen zeigten diese Hühner einen krankhaften Phänotyp. Dieser manifestierte sich in Entzündungen in der Milz, Muskelmagen und der Bildung von Granulomen an Schnabel, Ständern und Kamm. Außerdem zeigen die Tiere eine verminderte Entwicklung der lymphatischen Organe. Die weitere Analyse ergab, dass die humorale Immunabwehr der Hühner verringert war. Durch das Fehlen der CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen wurde weniger IL-4 und IL-5 gebildet, was anschließend zu einer geringeren B-Zell-Antwort führte, sodass weniger Antikörper produziert wurden. Weiterhin war die zytotoxische Immunreaktion erhöht. Durch das Fehlen von regulatorischen T-Zellen, war die Anzahl an Monozyten und CD8⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen erhöht.

Mithilfe der TCR C γ KO-Hühner wurde in dieser Arbeit die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen während der Epithelinfektion mit *Eimeria tenella* untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Shizonten weniger tief in die Submukosa der Hühner eindringen konnten. Die TCR2⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen zeigten einen kompensatorischen Effekt auf den Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen. Es konnten allerdings keine Unterschiede in der Stärke der Darmschädigung oder der Oozytenzahl zwischen den TCR C γ KO- und Wildtyp-Tieren festgestellt werden.

Durch den adoptiven Transfer von mCherry⁺ T-Zellen kann die Migration, Interaktion und Funktion von T-Zellen genauer studiert werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Zellzahlen und Gewebe für den adoptiven Transfer getestet. Hierbei war der Transfer von PBMCs am erfolgreichsten und es konnten mCherry⁺-Zellen im Empfängertier detektiert werden.

Um Erkenntnisse über die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen in Infektionsexperimenten zu gewinnen, ist ein induzierbarer $\alpha\beta$ T-Zell-KO notwendig, um den schwerwiegenden Phänotyp zu umgehen. Hierfür wurden in dieser Arbeit Cre-ER^{T2}-Chimären und eine loxP TCR C β ^{KI}-Keimzelllinien erstellt.

Summary

Chickens (*Gallus gallus domesticus*) are one of the most important livestock species worldwide, as both chicken meat and eggs are used as protein sources in the human diet. However, chickens are exposed to many potential pathogens, which also have an enormous zoonotic risk. With a deep knowledge of the immune system of chickens, these diseases can be combated and avoided more easily. T cells are an essential lymphocyte population of the acquired immune system. The cells are defined by their T cell receptor. This receptor consists of two chains, which in turn are divided into a constant and a variable region. The composition of the chains distinguishes between $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. This work investigated the role of the different T cell subpopulations using T cell knockout chickens.

First, the TCR C β KO chickens were phenotypically characterized. The chickens show a severe phenotype at around two weeks of age. This manifests itself in inflammation in the spleen, proventriculus, and granuloma formation on the beak, feet, and comb. In addition, the animals show reduced development of lymphatic organs. Further analysis revealed that the humoral immune defense in the chickens was reduced. Due to the absence of CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells, less IL-4 and IL-5 were produced, subsequently leading to a lower B cell response with fewer antibodies produced. Moreover, the cytotoxic immune response is increased. Due to the absence of regulatory T cells, the number of monocytes and CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells was increased.

Using the TCR C γ KO chickens, the role of $\gamma\delta$ T cells during epithelial infection with *Eimeria tenella* was investigated in this study. It was shown that the shizonts could penetrate less deeply into the chicken submucosa. The TCR2⁺ $\alpha\beta$ T cells showed a compensatory effect on the loss of the $\gamma\delta$ T cells. However, no differences in the severity of intestinal damage or oocyte numbers were observed between the TCR C γ KO and wildtype animals.

By using adoptive transfers of mCherry⁺ T cells, the migration, interaction, and function of T cells can be studied in more detail. This work tested different cell numbers and tissues for an adoptive transfer. The transfer of PBMCs was the most successful, and mCherry⁺ cells could be detected in the recipient animal.

In order to gain insights into the role of $\alpha\beta$ T cells in infection experiments, an inducible $\alpha\beta$ T cell KO is necessary to avoid the severe phenotype. For this purpose, Cre-ER^{T2} chimeras and a loxP TCR C β ^{KI} germ cell lines were generated in this work.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
μ	mi
ζ	zeta
ALV	Aviäres Leukose-Virus
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenin-Tri-Phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zellen	B-Lymphozyt
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
C β	Konstante Region der beta-Kette
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
C γ	Konstante Region der gamma-Kette
chSerum	Hühnerserum
Cre	Cyclization Rekombination
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CWC	Column Wash Solution
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
ddPCR	Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ED	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
eGFP	Enhanced Green Fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERB	Endotoxin Removal Buffer
ER ^{T2}	Östrogenrezeptor mit Dreipunkt-Mutation
ES	Embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie
FBS	Fetales Kälberserum
Fc	Fold change
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FITC	fluorescein-5-isothiocyanate
FoxP3	Forkhead-Box-Protein-3
FSC	Forward scatter
g	Relative Zentrifugalkraft (=rcf)

G	Gauge
GALT	Darmassziiertes Lymphatisches Gewebe (gut-associated lymphatic tissue)
GC	Germinales Zentrum
gDNA	Genomische DNA
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animal Science
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HDR	Homologe Rekombination (=homology directed repair)
HLA	humane Leukozyten-Antigene
HPAIV	Hoch pathogene aviäre Influenzaviren
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IBDV	Infektiöse Bursitis
IBV	Infektiöses Bronchitis Virus
I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
J β	Joining Gensegment der beta-Kette
KO	Knockout
LB	Luria-Bertrani
loxP	DNA-Erkennungsstelle
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting
MDV	Marek's Disease Virus
MHC	Hauptkompatibilitäts-Komplex
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (=non-homologous end joining)
PALS	Periarterioläre lymphatische Hüllen
PBMCs	Periphere Blut mononukläre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte-Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGCs	Primordiale Keimzelle
pT α	prä-TCR alpha Kette
PWP	Periellipsoide weiße Pulpa
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAG	Rekombinationsaktivierendes Gen 1
RCAS	Replikation-kompetentes aviäre Sarkoma-Leukosevirus
RNA	Ribonukleinsäure
Rp	rote Pulpa
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sgRNA	single guide Ribonukleinsäure
SSC	Sideward scatter

STM	Sucrose-Tris-Magnesiumchlorid
SPF	Spezifisch Pathogen frei
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR $\alpha^{-/-}$ Mäuse	Alpha beta T-Zelldefizitäre Mäuse
TCR C β KO	Alpha beta T-Zelldefizitäre Tiere
TCR C γ KO	Gamma delta T-Zelldefizitäre Tiere
TCR $\delta^{-/-}$ Mäuse	Gamma delta T-Zelldefizitäre Mäuse
TEN	Tris-EDTA-Natriumchlorid
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
T-Zelle	T-Lymphozyt
UV	Ultraviolett
V	Volt
V β 1/2	Variable Region der beta-Kette 1/2
WT	Wildtyp
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

T-Zellen stellen eine der wichtigsten Immunzellpopulation sowohl bei Hühnern als auch bei Säugetieren dar. T-Zell-Untergruppen werden durch den $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor (TCR) definiert. Im Gegensatz zu Mensch und Maus besitzen Hühner eine deutlich höhere Frequenz an $\gamma\delta$ T-Zellen, die bis zu 50% der peripheren Lymphozyten betragen kann. Über die Rolle von $\gamma\delta$ T-Zellen ist weder bei Mensch und Maus noch bei den sogenannten $\gamma\delta$ T-Zell-reichen Spezies wie Hühnern, Rindern und Schweinen viel bekannt. Die Einteilung der $\alpha\beta$ T-Zellen erfolgt in Säugetieren anhand ihrer Co-Rezeptoren und Zytokin-Expressionsmuster. Durch die fehlende Charakterisierung vieler Gene in Vögeln ist eine solche Klassifizierung im Huhn noch nicht möglich. Daraus resultiert die Notwendigkeit zur detaillierten Untersuchung der T-Zellen im Huhn.

Die Aviäre Kokzidiose ist eine durch *Eimerien* ausgelöste Krankheit, die schwere klinische Symptome bei Hühnern auslöst und damit weltweit immense wirtschaftliche Verluste verursacht. Die Primärinfektion mit *Eimeria* führt zur Entwicklung einer starken Immunität bei Hühnern, sodass diese bei einer erneuten Infektion immun gegen den Erreger sind. Die zugrunde liegenden Immunmechanismen sind noch weitestgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass T-Zell-vermittelte Immunreaktionen für die Eliminierung des Parasiten wesentlich sind und zum Immungedächtnis beitragen. Welche Rolle hierbei die intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen spielen wurde noch nicht vollends geklärt.

Durch präzises Targeting der konstanten Region der β - und γ -Kette des T-Zell-Rezeptors wurden Hühner generiert, die keine $\alpha\beta$ beziehungsweise $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen. Diese gentechnisch veränderten Hühner können nun eingesetzt werden, um die Rolle verschiedener T-Zell-Subpopulationen von Hühnern zu untersuchen.

2 Literaturteil

Das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) ist eine der wichtigsten Nutztierarten weltweit, da sowohl das Hühnerfleisch als auch die Eier als Proteinquellen in der menschlichen Ernährung genutzt werden. Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung muss bis 2050 die Produktion an Lebensmitteln um 70% gesteigert werden, wobei die Fleischproduktion um über 200 Millionen Tonnen ansteigen muss [1-3]. Hühnerfleisch ist dabei eines der günstigsten Lebensmittel in der Fleischproduktion, da für die Erzeugung von 1kg Hühnerfleisch lediglich 1,7kg Futtermittel benötigt werden [4]. Diese Bilanz kann nur von Aquakulturen übertroffen werden [5]. Außerdem hat Hühnerfleisch weniger schädliche Auswirkungen auf die Umwelt als andere Nutztiere und verbraucht weniger Wasserressourcen [4]. Zusätzlich zu den hochqualitativen Proteinen, die durch den Konsum von Geflügel und Eier aufgenommen werden, bietet Hühnerfleisch eine wertvolle Quelle für essentielle Mikronährstoffe, wie Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren, sodass Geflügel dazu beiträgt den Mangel an Meeresfischen auszugleichen [6].

Hühner sind allerdings vielen bakteriellen, viralen und parasitären Krankheitsrisiken ausgesetzt, die nicht nur zu großen ökonomischen Verlusten führen, sondern auch zoonotisches Potential besitzen und somit eine Bedrohung für die menschliche Gesundheit darstellen. Hierzu zählt vor allem die Vogelgrippe durch ihre hohe Mutationsrate [7-9]. Um die Hühner vor potenziellen Krankheiten zu schützen, ist es daher unerlässlich das Immunsystem des Haushuhns bis ins Detail zu verstehen. Zum einen trägt dieses Wissen zur Tiergesundheit bei, zum anderen kann es auch bei der Entwicklung von Impfstoffen genutzt werden und zur Vermeidung von Antibiotikaresistenzen führen [10].

2.1 Das Immunsystem des Haushuhns

Das Haushuhn ist ein gutes Modell, sowohl für Entwicklungsbiologie als auch um die Grundlagen des Immunsystems bei Vögeln zu erforschen. So führte die Entdeckung der Bursa Fabricius im Huhn zu der allgemeinen Abgrenzung zwischen B- und T-Zellen [11]. Eine weitere Studie über Interferenz zwischen hitzeinaktivierten Influenzaviren und lebenden Viren in Eiern hatte die Entdeckung des Interferons (IFN) zur Folge [12].

Grundsätzlich wird das Immunsystem von Hühnern wie auch bei Säugetieren in zwei Teile eingeteilt, das angeborene und das erworbene Immunsystem [13, 14]. Die angeborene Immunantwort gilt als die erste unspezifische Abwehrreaktion gegen Pathogene. Genauer fungiert das angeborene Immunsystem als konstitutive Barriere zur Bekämpfung von extra- und intrazellulären Pathogenen. Hierbei sind die Epitheloberflächen [15], das Komplementsystem [16], Phagozyten, wie Makrophagen und Granulozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Zytokine, wie beispielsweise IFN, die Hauptakteure [17, 18].

Das erworbene Immunsystem besteht aus zwei Teilen, der zellulären und humoralen Immunantwort. Die zelluläre Immunantwort wiederum wird in zwei Gruppen gegliedert: Auf der einen Seite stehen die antigenpräsentierenden Zellen, zu welchen vor allem dendritische Zellen, aber auch Makrophagen und B-Zellen zählen. Sie dienen dazu Erreger zu erkennen und entsprechende Antigene den T-Zellen zu präsentieren, um diese zu aktivieren [19]. Auf der anderen Seite stehen die Lymphozyten, die durch ihre Spezifität und Diversität eine gerichtete Immunantwort herbeiführen können. Zu den Lymphozyten zählen sowohl B-Zellen als auch T-Zellen. Die humorale Immunantwort ist definiert durch Immunglobuline (Ig), die zur direkten Erregereliminierung beitragen und durch B-Zellen gebildet werden [13, 14]. Hühner-IgM wird als Antwort auf eine Infektion produziert und spielt daher eine Rolle in der initialen Immunantwort. IgA kommt vor allem auf Schleimhäuten vor und trägt zum Schutz der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes und des Genitaltraktes bei. IgY vermittelt eine langfristige Immunität und spielt daher eine Rolle bei der sekundären Immunantwort [17].

2.1.1 Entwicklung, Differenzierung und Funktionen von Hühner T-Zellen

Die Antigenerkennung durch T-Zellen wird vermittelt durch den TCR. Es wird unterschieden zwischen dem $\alpha\beta$ TCR und dem $\gamma\delta$ TCR, den zwei Hauptgruppen der T-Zellen. Der TCR ist ein heterodimärer Oberflächenrezeptor, der aus jeweils zwei Ketten (α/β beziehungsweise γ/δ) besteht (siehe Abbildung 1). Jede dieser Ketten wiederum bildet sich aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Region. Die α - und γ -Ketten sind unwesentlich kleiner als die β - und die δ -Ketten des TCR [13, 17, 20]. Neben dem TCR befindet sich zwei heterodimäre Cluster of Differentiation (CD) 3-Komplexe und zwei ζ -Polypeptide, die für die Signaltransduktion zuständig sind [21] (siehe Abbildung 1).

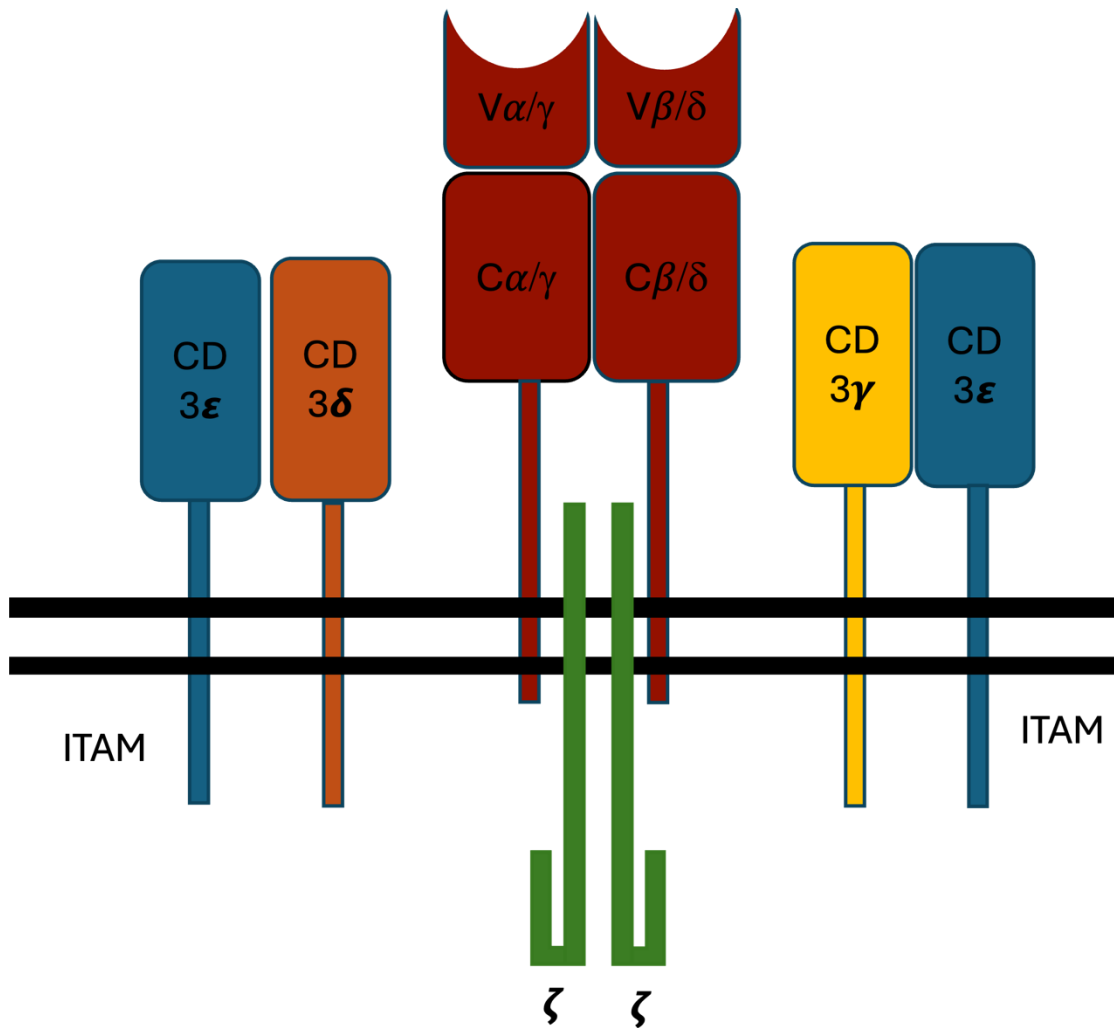


Abbildung 1: Struktureller Aufbau des T-Zell-Rezeptors: Der $\alpha\beta/\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei Ketten, die jeweils aus einer konstanten (C) und variablen (V) Domäne bestehen. Zudem befinden sich vier CD3-Moleküle und zwei ζ -Ketten neben dem TCR, die mithilfe der Phosphorylierung konservierter Motive (ITAMs) die Signaltransduktion des TCRs einleiten. Abbildung adaptiert von [17].

Die T-Zellen entwickeln sich nach Einwanderung in den Thymus aus Vorläufer-T-Zellen des Knochenmarks. Die ersten Vorläufer-T-Zellen wandern an Embryonaltag (ED)7 in den Thymus ein. Fünf Tage später (ED12) können die ersten $\gamma\delta$ T-Zellen im Thymus nachgewiesen werden. Die Frequenz der $\gamma\delta$ T-Zellen steigt daraufhin bis ED15 an. $\alpha\beta$ T-Zellen, die die V β 1-Domäne exprimieren, können das erste Mal an ED15 im Thymus nachgewiesen werden. Als letzte Gruppe differenzieren sich die V β 2⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen um ED18 aus [22-24]. $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren zunächst beide Oberflächenrezeptoren CD4 und CD8, werden aber daraufhin im Kortex des Thymus durch die Thymusepithelzellen zu CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen positiv selektiert [25-27](siehe Einleitung 2.2.1). Vor der Reifung der T-Zellen gibt es zusätzlich noch eine sogenannte prä-TCR α -Kette (pT α), die

zusammen mit der TCR β -Kette einen prä-TCR formt. Dieser Prä-TCR ist für die Entwicklung des Thymus zuständig [28].

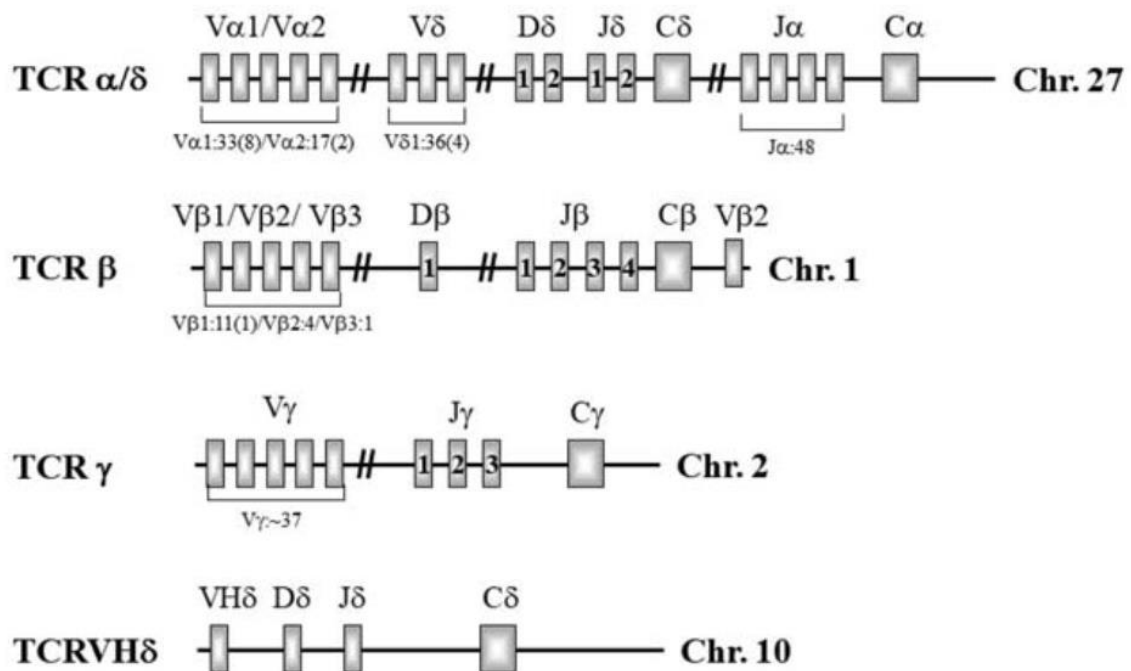


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hühner-TCR Genloci. Der TCR α -Genlocus befindet sich auf Chromosom 27. Inmitten des TCR α -Locus befindet sich ebenfalls ein Teil des TCR δ -Locus. Der TCR β -Locus befindet sich auf Chromosom 1, während sich TCR γ -Locus auf Chromosom 2 befindet. Hühnervögel (*Galliformes*) besitzen einen weiteren TCR δ ähnlichen Locus auf Chromosom 10. Abbildung übernommen von Schat et al. [17]

Die vier verschiedenen Ketten des TCR setzen sich alle aus variablen (V), gefolgt von diversen (D) und joining (J) Gensegmenten und einem konstanten (C) Segment zusammen. Der Hühner TCR β -Locus enthält zwei V β -Genfamilien, vierzehn D β -Gensegmente, vier J β -Teile und einen C β -Locus. Der TCR δ -Locus befindet sich, wie bei Säugetieren, inmitten des TCR α -Locus. Während der somatischen Rekombination bei Hühnern werden zufällig der V (D) J Gene hinzugefügt und deletiert, sodass eine sehr hohe Diversität der einzelnen T-Zell-Rezeptoren entsteht [29, 30].

2.1.1.1 $\alpha\beta$ T-Zellen in Hühnern, die Hauptakteure der adaptiven Immunantwort

$\alpha\beta$ T-Zellen werden unterteilt in CD4⁺-Helfer T-Zellen, die Hauptkompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle der Klasse II, und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, welche MHC-Moleküle der Klasse I binden. Die CD4⁺ T-Zellen aktivieren daraufhin B-Zellen, was die Sezernierung von Antikörpern zur Folge hat [25, 26]. Im Vergleich zu Säugetieren gibt es beim Huhn keine

klare Einteilung in Th1, Th2 und Th17, da die Einteilung auf der Sezernierung verschiedener Interleukine beruht und diese im Huhn teilweise noch nicht beschrieben worden sind [31]. Abbildung 3 zeigt die bisher im Huhn beschriebenen Interleukine der CD4⁺ T-Helferzellen basierend auf der Säugetiereinteilung in T-Helferzell-Subpopulationen.

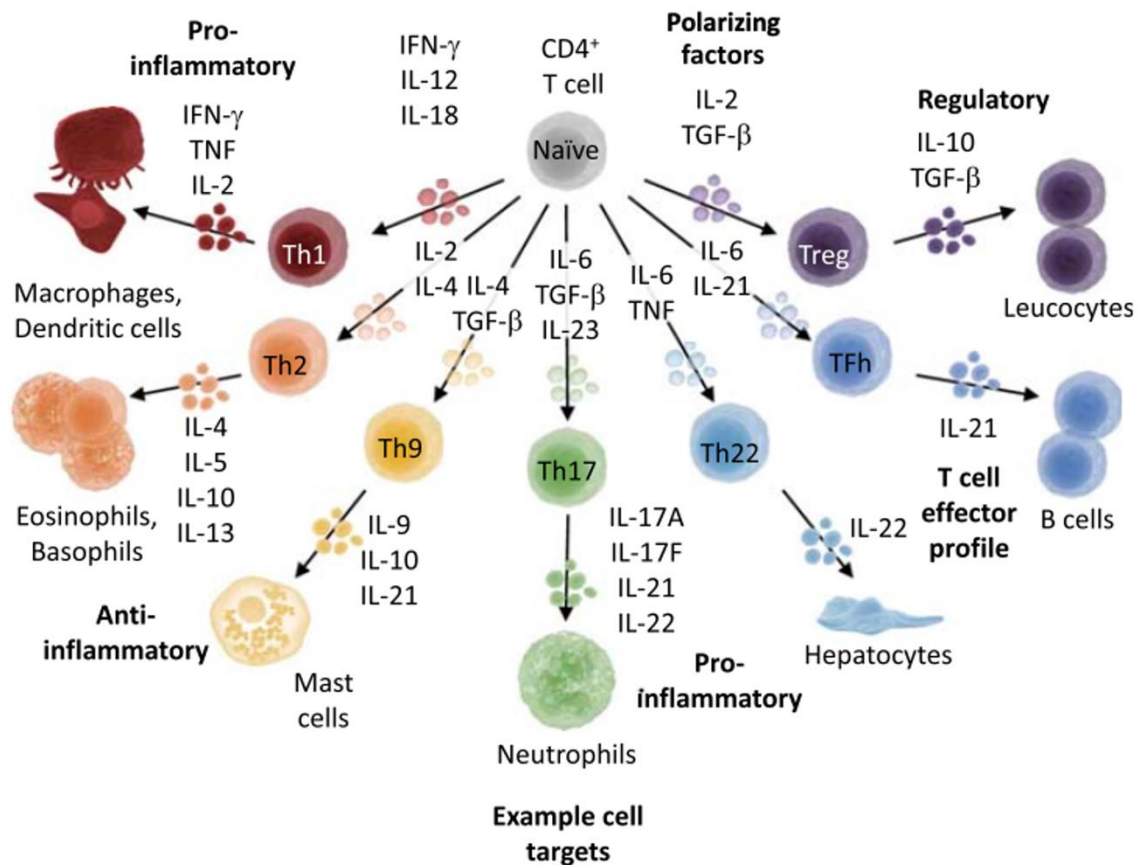


Abbildung 3: Bekannte Interleukine der CD4⁺ T-Helferzellen im Hühnengenom schematisch dargestellt basierend auf dem Schema von Säugetieren. Naïve T-Helferzellen differenzieren sich basierend auf ein Antigenstimulus aus, indem verschiedene Zytokine freigesetzt werden. Die hier abgebildeten Interleukine wurden bereits im Huhn annotiert und besitzen vermutlich dieselben Funktionen wie ihre Säugetierorthologe. Abbildung adaptiert von Schat et al. [17]

Im Menschen sind elf Liganden der IL-1 Genfamilie bekannt. Im Huhn wurden bisher nur vier Vertreter der IL-1 Genfamilie beschrieben: IL-1 β , IL-18, IL1RN und IL-36RN [32]. Durch Unterschiede in den Basensequenzen der Zytokine im Huhn im Vergleich zu den Säugetierorthologen, ist die Identifizierung und Amplifikation der Gene mithilfe von Primern basierend auf den Säugetiersequenzen meistens ineffizient [17].

Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor in regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Die T_{regs} wurden wegen ihrer GC reichen Sequenz erst 2013 in der Tibetmeise annotiert [33]. Im Thymus wird FoxP3 hauptsächlich durch doppelnegative CD25⁺ T-Zellen exprimiert. In den peripheren lymphatischen Organen wie Milz und Caecal-

Tonsillen wird die FoxP3-Expression mit einem Teil der CD4⁺CD25⁺-Subpopulation assoziiert. Innerhalb der CD4⁺CD25⁺ Population wurde die höchste Expression von FoxP3 in der CD25^{high+} Population gefunden. T_{regs} haben eine immununterdrückende Rolle und exprimieren IL-10 und TGFβ [34, 35].

Die CD8⁺ T-Zellen erkennen den MHC-Klasse I Komplex und differenzieren sich daraufhin zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) aus. CTLs tragen durch die Freisetzung von lysierenden Zytokinen, wie Perforin und Granzym B, direkt zu einer Erregerelimination bei und können durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon-γ (IFN-γ) und IL-1β direkt und indirekt zur Beseitigung von Viren beitragen [36]. Der CD8-Rezeptor besteht aus zwei Ketten, CD8α und CD8β. Diese wiederum können zwei Isotypen bilden, CD8αα-Homodimer oder CD8αβ-Heterodimer [37]. Hühner besitzen zudem eine große Population von CD4⁺CD8αα⁺ doppelpositiven T-Zellen in Blut, Milz und den intraepithelialen Lymphozyten (IEL), die in ihrer Funktionsfähigkeit ruhenden CD4⁺ T-Zellen ähneln [38]. Im Menschen werden doppelpositive CD4⁺CD8⁺ hingegen mit dem Auftreten von Autoimmunkrankheiten wie Thyreoiditis assoziiert [39].

T-Zell-Aktivierungsmarker werden während einer Immunreaktion in T-Zellen exprimiert. Aktivierungsmarker tragen dazu bei den Status von T-Zellen genauer zu beschreiben. Hierbei zählen CD25 und MHC II zu den frühen und CD28 zu den späten Aktivierungsmarkern [40]. Zudem gehört CD57 zu den Gedächtnis T-Zellmarkern [40]. Obwohl bekannt ist, dass αβ T-Zellen in vielen Infektionen in Hühnern eine tragende Rolle spielen, ist die genaue Rolle der Subpopulationen während einer Infektion noch unerforscht.

2.1.1.2 Die unbekannte Rolle der γδ T-Zellen

Hühner haben im Vergleich zu Mensch und Maus, mit bis zu 50% der peripheren lymphatischen Zellen, eine hohe Frequenz an γδ T-Zellen [41]. Sie zählen damit zu den γδ reichen T-Zell-Spezies, wie auch Rinder (20-40%) [42], Schweine (30%)[43] und Ziegen (5-20%)[44]. Im Vergleich besitzen Menschen und Mäuse nur 1-10% γδ T-Zellen innerhalb der Blutlymphozyten [45]. Trotz der hohen Frequenz ist über die Rolle der γδ T-Zellen im Huhn wenig bekannt. Im Gegensatz zu αβ T-Zellen können γδ T-Zellen ihre Liganden MHC-

unabhängig erkennen [46]. Außerdem wurde ein Anstieg an $\gamma\delta$ T-Zellen während der Infektion mit *Salmonellen* [47], sowie mit *Eimeria acervulina* [48] beschrieben. $\gamma\delta$ T-Zellen werden unterschieden in CD8^{high}-, CD8^{dim}- und CD8^{neg}-Subpopulationen, die unterschiedlich auf Krankheitserreger wie *Salmonellen* reagieren [49]. Sie haben eine zytotoxische Aktivität [50] und sind involviert in die Graft-versus-Host-Reaktion [51]. Ein Großteil der $\gamma\delta$ T-Zellen migriert nach der Ausreifung in die Darmepithelien. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen an der Aufrechterhaltung der Darmintegrität beteiligt sind [52] und damit die Hauptproduzenten des proinflammatorischen IL-17A im Darm für die Pathogenabwehr sind [53]. Außerdem zeigten TCR $\delta^{-/-}$ Mäuse eine geringere Überlebensrate während der Infektion mit hoch pathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV)[54].

2.2 Lymphatische Organe des Haushuhns

Die lymphatischen Organe von Hühnern sind essenziell für die Reifung, Differenzierung und Vermehrung der Lymphozyten, insbesondere der T-Zellen. Man unterscheidet generell zwischen primären und sekundären lymphatischen Organen. Beim Huhn zählen der Thymus wie auch die Bursa Fabricii zu den primären lymphatischen Organen, da hier T-Zellen beziehungsweise B-Zellen sich entwickeln und differenzieren [55, 56]. Die Milz ist wohl das wichtigste sekundäre lymphatische Organ [57, 58]. Weiter gehören die Harderschen Drüsen [59], und das Darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) bestehend aus den Caecal Tonsillen [60, 61], Peyers's Patches [62] und dem Meckelschen Divertikulum [61] zu den sekundären lymphatischen Organen im Huhn.

2.2.1 Aufbau und Funktion des Thymus im Huhn

Der Thymus des Haushuhns besteht aus sieben bis acht Lobi, die vom dritten Halswirbel bis zum oberen Brustkorbsegment reichen [17]. Der Thymus selbst wächst bis zum vierten Lebensmonat auf die maximale Größe von sechs bis zwölf Millimeter an, danach beginnt die Involution des Thymus. Die Struktur des Thymus wird unterteilt in Kortex und Medulla (siehe Abbildung 4) [55, 63].

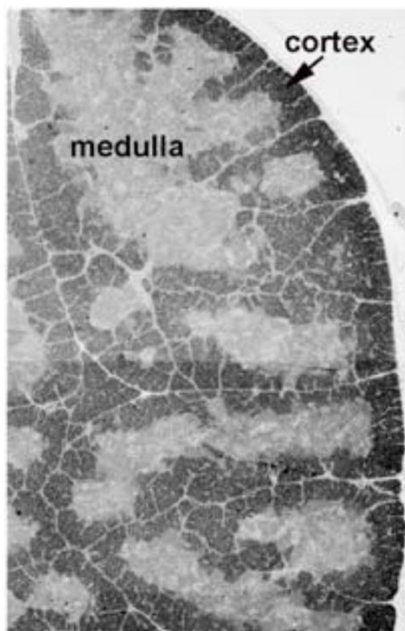


Abbildung 4: Aufbau des Thymus. Der Thymus besteht aus sieben bis acht Lobli, die in Kortex (dunkelgrau) und Medulla (hellgrau) aufgeteilt werden. T-Zellen migrieren während ihrer Reifung durch den Kortex und wandern dann in die Medulla ein. An der kortikomedullären Grenze findet die negative und positive Selektion der naiven T-Zellen statt, die daraufhin in der Medulla weiter ausdifferenzieren. Abbildung adaptiert von Schat et al. [17].

Während der T-Zell-Reifung wandern die T-Zellen an die Grenze zwischen Kortex und Medulla, wo die Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen sowohl positiv als auch negativ selektiert werden. Bei der positiven Selektion präsentieren die Thymusepithelzellen Peptide, die durch MHC-Moleküle komplexiert sind. Diese werden wiederum von den unreifen T-Zellen mit mittlerer Affinität gebunden werden. Je nach MHC-Klasse differenzieren sich daraus $CD4^+$ oder $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen. Bei zu geringer Bindung werden die T-Zellen aussortiert. Bei der negativen Selektion werden körpereigene Peptide präsentiert. T-Zellen, die an diese Peptide binden, werden in Apoptose geschickt [64, 65]. Nach der Selektion dringen die T-Zellen in die Medulla des Thymus ein, wo die weitere Reifung der Zellen stattfindet [23].

2.2.2 Die Milz als zentrales, sekundäres lymphatisches Organ

Die Hühnermilz ist ein ovales Organ, welches lateral des Proventrikulus angesiedelt ist und in welchem durch Antigenkontakt und klonale Vermehrung Lymphozyten zu Effektor- und Regulatorzellen ausdifferenziert werden [58]. Die Milz besteht aus einer roten und einer weißen Pulpa. Die rote Pulpa ist für die Blutfiltration zuständig. Vereinzelt kommen auch T-Zellen in der roten Pulpa vor, hierbei handelt es sich vor allem um $CD8^+$ $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen (siehe Abbildung 5) [57]. Die weiße Pulpa besteht aus den folgenden

morphologischen Abschnitten: Zum einen aus periarteriolen lymphatischen Hüllen (PALS), welche entlang der zentralen Arterien verlaufen und vor allem aus $CD3^+$ T-Zellen bestehen. Zum anderen enthält sie die periellipsoide weiße Pulpa (PWP), die auch als periellipsoide Lymphozytenscheide bezeichnet wird und aus B-Zellen besteht, analog zur Marginalzone der germinalen Zentren bei Säugetieren (siehe Abbildung 5) [66]. Das Ellipsoid ist für die Filtration der Antigene aus dem Blut zuständig. Germinale Zentren (GC) sind eine runde Einkapselung von B-Zellen, die von T-Zellen umgeben werden, welche sich nach der Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen bilden (siehe Abbildung 5). Die Germinalen Zentren dienen zur Affinitätsreifung des B-Zell-Repertoires, um die Affinität von Antikörpern zu steigern oder einen Klassenwechsel von IgM zu IgA beziehungsweise IgY zu vollziehen [67].

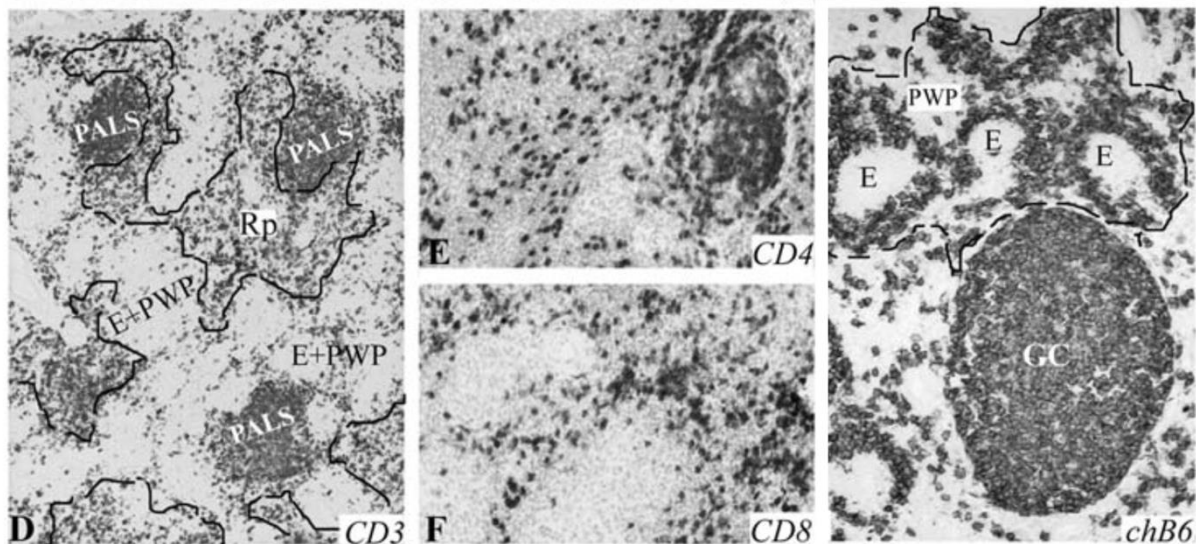


Abbildung 5: Aufbau der Milz. Die Milz von Hühnern wird aufgeteilt in rote (Rp) und weiße Pulpa. Die weiße Pulpa, gliedert sich daraufhin in die periarteriolen lymphatische Hülle (PALS), welche vorwiegend aus $CD3^+$ T-Zellen besteht und die periellipsoide weiße Pulpa (E+PWP), bestehend aus B-Zellen. Bei den $CD3^+$ Zellen handelt es sich sowohl um $CD4^+$ T-Helferzellen als auch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. Die B-Zellen können nach Immunisierung sogenannte germinale Zentren (GC) bilden zur weiteren Differenzierung. Abbildung adaptiert von Schat et al. [17].

2.2.3 Reifung der B-Zellen in der Bursa des Fabricius

Die Bursa des Fabricius ist ein lymphatisches Organ das exklusiv bei Vögeln vorkommt und für die Entwicklung und Reifung der B-Zellen zuständig ist. Sie hat die Form und Größe einer Walnuss und liegt zwischen der Kloake und dem Sakrum. Wie auch der Thymus erreicht die Bursa ihre maximale Größe nach acht bis zehn Wochen, und bildet sich dann langsam zurück. Die Bursa besteht aus 15 bis 20 Längsfalten, die wiederum aus Foliolen bestehen, die in zwei Strängen entlang der Blutgefäße verlaufen (siehe Abbildung 6) [11].

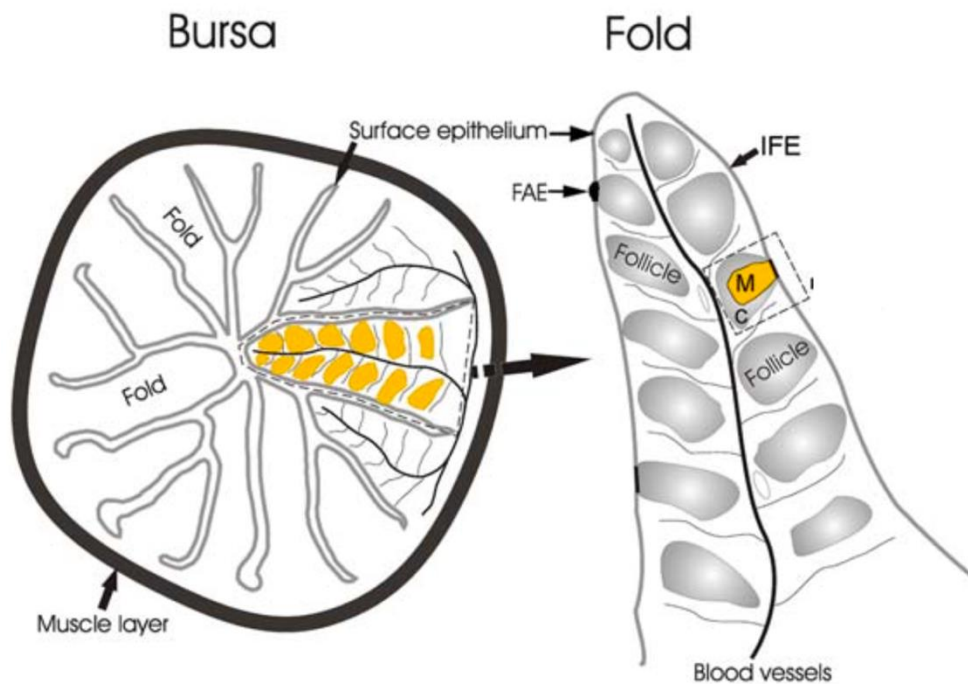


Abbildung 6: Aufbau der Bursa Fabricii. Die Bursa des Fabricius ist ein rundes Organ, welches aus Längsfalten besteht. Die Längsfalten wiederum bestehen aus Follikeln, die sich rechts und links um die Venen anlegen. In diesen Follikeln reifen die B-Zellen. Nach außen hin besitzt sie eine Muskelschicht. Abbildung übernommen von Schat et al. [17].

B-Zellen reifen und differenzieren sich sowohl im Kortex als auch der Medulla der Bursafollikel aus. Teilweise kommen T-Zellen am Kortex der Bursa vor und davon wandert eine kleine Anzahl in die Medulla ein [68]. Die Rolle der T-Zellen in der Entwicklung der Bursa ist bisher unbekannt. Dennoch spielen intrabursale T-Zellen eine Rolle bei der Bekämpfung von Viruserkrankungen, wie der infektiösen Bursitis (IBDV) [69].

2.2.4 Das darmassoziierte lymphatische Gewebe

Das GALT besteht aus Lymphozyten, die im Epithelialen Gewebe angesiedelt sind [17]. Zu diesem zählen das Meckelsche Divertikulum [61], Peyer's Patches [62] und die Caecal-Tonsillen [60]. Die Ansiedlung der Immunzellen im Darm führt zu einer schnellen Immunantwort beim Eindringen von Erregern. Sie beinhalten eine diverse Komposition aus Immunzellen, wie Heterophile, Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen und natürlich B- und T-Zellen [17]. Zusätzlich zu den abgegrenzten Lymphozytenstrukturen beinhaltet das GALT auch die sogenannten intraepithelialen Lymphozyten (IELs). Als IELs werden vor allem NK-Zellen, die als $CD8^+CD3^-$ -Zellen im Huhn beschrieben werden, und $CD8^+ \alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen bezeichnet [48, 70]. Diese IELs spielen eine große Rolle in der Abwehr von Darmerregern, wie beispielsweise *Salmonellen* [47] oder *Eimerien* (2.4).

2.3 Untersuchung der T-Zell-Populationen mittels genetisch veränderter Hühner

Um die Rolle der T-Lymphozyten und ihrer Untergruppen im Detail zu verstehen, werden präzise Genknockout-Modelle benötigt. Bei Mäusen stehen bereits verschiedene T-Zell Knockout-Modelle zur Verfügung [54, 71-73]. TCR β Knockout (KO)-Mäuse zeigen häufiger eine Entzündung der Magenschleimschicht als TCR α KO-Mäuse [71], weisen aber ansonsten keine Unterschiede zu WT-Mäusen auf. Interessant ist auch die Beobachtung, dass TCR β KO-Mäuse nicht in der Lage sind, germinale Zentren zu formen, während TCR α KO-Mäuse unter denselben Haltungsbedingungen die Formierung von Germinalen Zentren zeigen. Beide Knockouts haben $\gamma\delta$ T-Zellen, allerdings scheint eine Subgruppe von CD4⁺ TCR β -Zellen für die Formierung der germinalen Zentren in TCR α KO-Mäusen zuständig zu sein [72]. Durch den Knockout von FoxP3 der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), kommt es bei Mäusen zu einem stark ausgeprägten Phänotyp. Geprägt ist dieser Phänotyp durch autoimmune Entzündungsreaktionen und einer gestörten humoralen Immunantwort, die zu einer hyperresponsiven Reaktion der CD4⁺ T-Zellen führt [74, 75]. Bevor die Generierung von genetisch veränderten Hühnern möglich war, wurde versucht die T-Zellen im Huhn mittels Antikörperinjektion und Thymektomie zu depletieren. Hierfür wurden im Hühnerembryo die T-Zellen durch die mehrfache Gabe des TCR2-Antikörpers ausgeknockt, der spezifisch die V β 1-Region des T-Zell-Rezeptor blockiert. Nachfolgend wurde eine Thymektomie acht Tage nach dem Schlupf durchgeführt. Hierbei konnten aber die TCR3⁺ T-Zellen den Verlust der TCR2⁺ T-Zellen kompensieren, was folglich zu einer unvollständigen Depletion führte [76].

2.3.1 Erstellung genetisch veränderter Hühner

Obwohl in Mäusen der Einsatz von embryonalen Stammzellen (ES) zur Erzeugung von genetisch veränderten Mäusen weit verbreitet ist [77], konnte im Huhn keine Keimbahntransmission durch genetisch veränderte Hühner-ES-Zellen gezeigt werden [78]. Daher wurde das erste genmodifizierte Huhn mithilfe von aviären Leukose-Viren (ALV) erzeugt, wodurch eine Mutation in der Keimbahn von Hühnern induziert werden konnte [79]. Love et al. (1994) generierte daraufhin das erste genetisch modifizierte Huhn durch die Injektion von Plasmid-DNA mittels Mikroinjektion [80]. Ebenso führt der Einsatz von lentiviralen Vektoren in G0-Vögeln [81] oder Replikation-kompetenten aviären

Sarkoma-Leukose Virus (RCAS) zu der genetischen Veränderung von Hühnern [82]. Die Entdeckung der Kultivierbarkeit von primordialen Keimzellen (PGCs), führte zur Revolution der Generierung genetisch modifizierter Hühnerlinien. PGCs sind die ersten Keimzellen und die Vorläuferzellen von Oozyten und Spermazellen [78]. Van de Lavoie et al. (2006) gelang es zuerst PGCs bis zu 110 Tage zu kultivieren, mit dem grünen Fluoreszenzgen eGFP zu transfizieren und sie in den Embryo im Hamburger- und Hamilton-Stadium 13-15 zu reinjizieren, welches zur erfolgreichen Expressierung von eGFP in der folgenden Generation im Embryo führte [78]. Schusser et al. (2013) gelang es über homologe Rekombination einen spezifischen Gen-Knockout im J-Segment der schweren Immunglobulin Kette in PGCs zu erstellen und hieraus JH-KO-Hühner zu generieren [83].

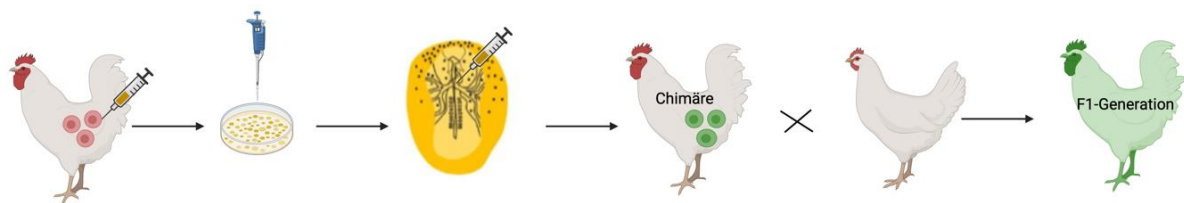


Abbildung 7: Generierung von genetisch modifizierten Hühnern durch die Injektion von modifizierten PGCs. Zur Generierung genmodifizierter Hühnerlinien wird zunächst Blut aus 65h alten Embryos genommen. Die hieraus gewonnenen PGCs werden dann kultiviert und mit der gewünschten DNA-Kassette transfiziert. Die PGCs mit der gewünschten Modifikation werden dann in 65h alte Embryos reinjiziert. Nach dem Schlupf dieser Tiere werden die männlichen Chimären zur Geschlechtsreife aufgezogen. Das Spermium wird auf die gewünschte Genmodifikation getestet. Die Keimbahn positiven Hähne werden dann mit Wildtyp-Hennen verpaart, um die F1-Generation an genmodifizierten Tieren zu erhalten. Abbildung adaptiert von [84, 85]

Später wurden die Kulturbedingungen für PGCs verbessert, um die embryonale Keimzellumgebung zu imitieren [86]. Seitdem wurde bereits viele genetisch veränderte Hühnerlinien generiert, die zur immunologischen Erforschung von Hühnern beitragen. Unter anderem wurden Hühner generiert, die resistent gegen das hochpathogene aviäre Leukosisvirus Subgruppe J (ALV-J) sind, indem eine Mutation in den NHE1-Rezeptor eingefügt wurde [87].

2.3.2 Nutzung von CRISPR/Cas9 zur Erstellung von genetisch veränderten Hühnern

Der Einsatz der Genschere CRISPR (Clustered Regularly Interspaced short Palindromic Repeats) / Cas9 ermöglicht es bestimmte Gene gezielt auszuknocken oder zu verändern. Hierfür wird ein Cas9-Gen mit einer single guide (sg)RNA zu einem Plasmid verbunden und daraufhin in PGCs transfiziert. Die Basensequenz der sgRNA zeigt dem Cas9-Protein daraufhin das gewünschte Gen an, sodass das Cas9-Protein daraufhin einen

Doppelstrangbruch an den Bindungsstellen bewirkt [88]. Bei der Reparatur der DNA kommt es zur sogenannten nicht-homologen Endverknüpfung (non homologous endjoining = NHEJ). Hierbei werden Basenpaare an der Stelle des Doppelstrangbruches eingefügt und beziehungsweise gelöscht, sodass es zu Punkt- oder Frameshift-Mutationen kommen kann [89]. Eine weitere Möglichkeit der Reparatur bietet die Homologie gerichtete Reparatur (HDR), bei welcher ein DNA-Stück durch die Anlagerung von Homologiearmen bei der Reparatur eingefügt wird [90].

2.3.3 TCR KO-Hühner

Die TCR C β und TCR C γ Knockout-Hühner, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden mittels Mikroinjektion von genetisch modifizierten PGCs generiert. Hierfür wurde die konstante Region des TCRs in PGCs deletiert, indem hier mithilfe CRISPR/Cas9 HDR zunächst eine DNA-Kassette eingefügt wurde. Diese DNA-Kassette ermöglichte zudem die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen durch das eingefügte Puromycin-Resistenzgen. Um allerdings negative Effekte durch die eingefügte DNA-Kassette zu vermeiden, wurde nach der Antibiotikaselektion die Kassette mittels Cre-Rekombinase (kurz für cyclization recombination) an den loxP-Erkennungsstellen ausgeschnitten. Die TCR C β / γ KO-Hühner haben anstatt der konstanten Region in der β - oder γ -Kette eine Loop out-Region und können somit keinen TCR formen [91].

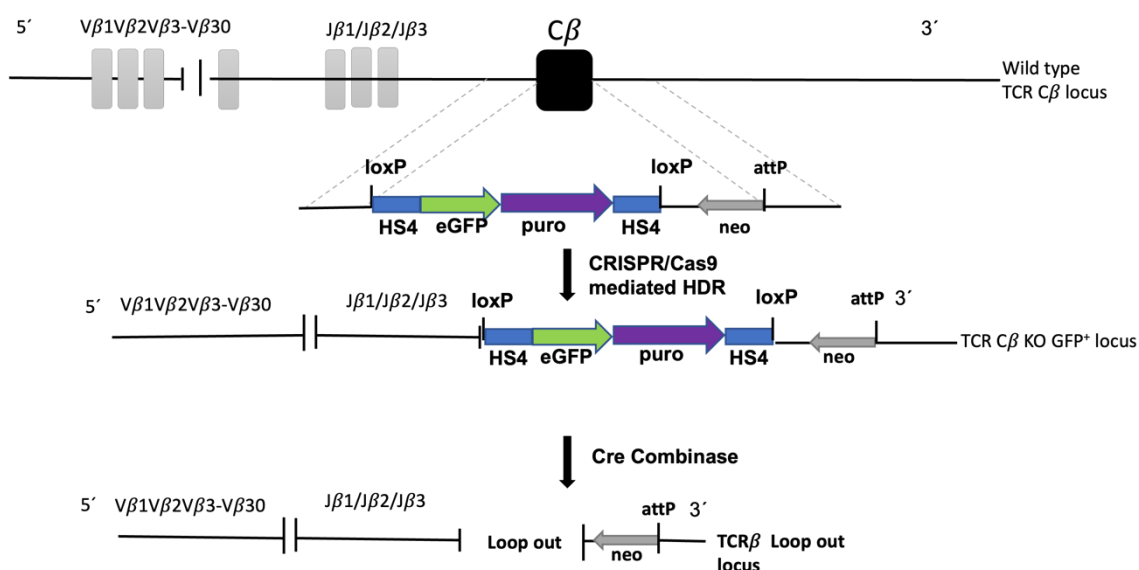


Abbildung 8: TCR C β Knockout-Strategie. Um die konstante Region des TCR C β Locus auszuknocken wurde mittels CRISPR/Cas9 HDR eine DNA-Kassette eingefügt, die zur Selektion ein grünes Fluoreszenzgen (eGFP) und ein Puromycin-Resistenzgen besitzt, sowie loxP-Erkennungsstellen enthält. Nach der Antibiotikaselektion wurde die Kassette mittels Cre-Rekombinase ausgeschnitten, um bekannte, negative Effekte in den generierten Tieren durch die selektierbare Marker-Kassette zu vermeiden. Abbildung adaptiert von Heyl et al. [91].

2.3.4 mCherry⁺ exprimierende Hühner als Reporterlinie für den adoptiven Transfer von T-Zellen

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit mCherry⁺-exprimierende Hühner verwendet, um ein adoptives Transfersystem zu etablieren, in welchem die transferierten Zellen im Empfängerhuhn verfolgt werden können. Die mCherry⁺-exprimierenden Hühner wurden von Trefil et.al. (2017) generiert. Die Autoren konnten mithilfe der mCherry⁺-Expression nachweisen, dass durch die Transplantation von PGCs die männliche Fertilität in zuvor durch Strahlung sterilisierten Hähnen wiederhergestellt werden kann. Die mCherry⁺-Hühner exprimieren das mCherry⁺-Fluoreszenzgen in jeder Zelle unter dem Hühner beta-actin Promotor. Sie zeigen einen starken Phänotyp, da das Fluoreszenz Signal auch ohne UV-Licht deutlich als pinke Farbe an Schnabel, Beinen und der Haut der Hühner erkennbar ist (siehe Abbildung 9) [92].

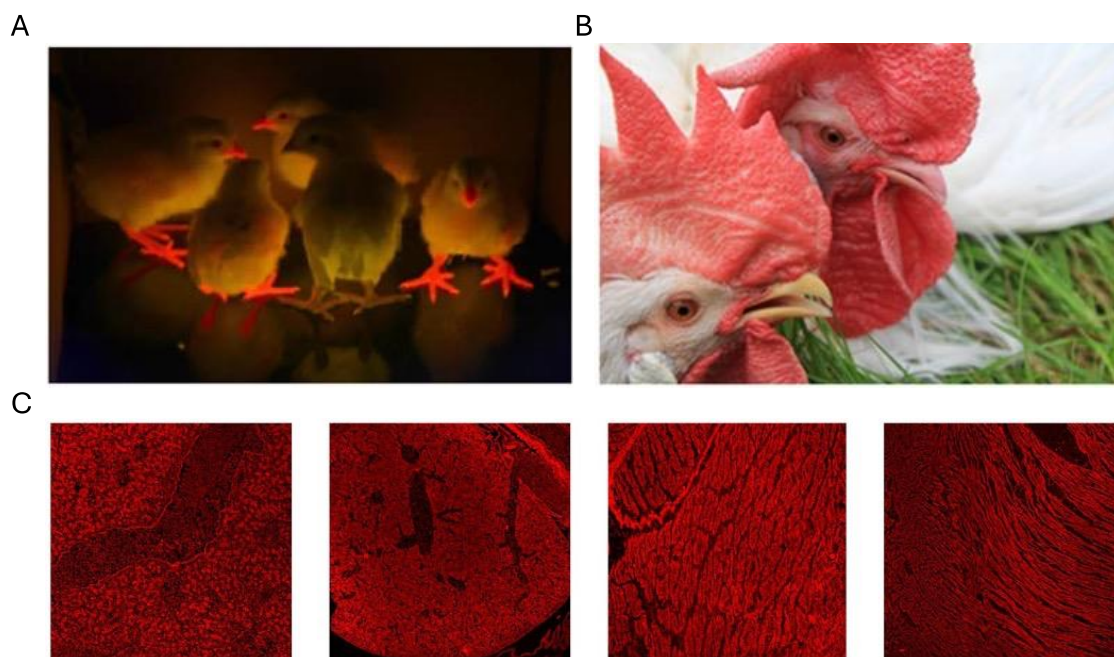


Abbildung 9: Phänotyp der mCherry⁺-Hühner. Der Phänotyp der mCherry⁺-Hühner zeigt, ein ausgeprägtes rotes Fluoreszenz-Signal an Schnabel und Ständern, sodass die Hühner mithilfe von UV-Licht genotypisiert werden können. Auch ohne UV-Licht besitzen die Tiere eine ausgeprägte rote Farbe des Kammes. Außerdem zeigen alle Organe, wie Leber, Milz, Muskel und Herz mCherry⁺-Signale. Abbildung adaptiert von Trefil et al. [92].

2.3.5 Induzierbare KO-Systeme

Im Gegensatz zu einem permanenten Knockout kann der induzierbare Knockout zu einem beliebigen Zeitpunkt an- und ausgeschaltet werden. Glover et al. (2013) konnte bereits ein induzierbares Expressionssystem in Embryos etablieren, um die Rolle von Akt-Signalen

während der PGC-Migration zu analysieren. Hierbei wurde ein Tetracyclin-basiertes System gewählt [93]. Eine Variante des induzierbaren Knockouts ist das Cre-ER^{T2} System, welches durch die Gabe von Tamoxifen aktiviert wird, [94]. Cre-Rekombinase ist ein Enzym, welches aus P1-Bakteriophagen stammt [95]. Das Enzym nutzt einen Topoisomerase-ähnlichen Mechanismus, um an spezifischen DNA-Erkennungsstellen (loxP-Stellen) eine Rekombination zu erzielen und wird in der Biotechnologie zum Ausschneiden von Genen genutzt [96]. Um die Expression von Cre zeitlich zu steuern, können konditionale Expressionssysteme eingesetzt werden [97]. Tamoxifen-induzierte Östrogenrezeptor (ER)-Domänen zählen zu dem am häufigsten verwendeten konditionalen Expressionssystemen [98]. Es handelt sich hierbei um eine Fusion zwischen einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des menschlichen Östrogenrezeptors (ER) mit der Cre Rekombinase. Es gibt zwei verschiedene Arten von ER-Mutationen: eine Einpunkt-Mutation (ER^T) oder eine Dreipunkt-Mutation (ER^{T2}) [99]. Diese Mutationen verhindern die Bindung des Östrogenrezeptors an seinen natürlichen Liganden Östrogen. Gleichzeitig verleihen sie ihm aber eine hohe Affinität zu einem synthetischen anti-Östrogen 4-Hydroxy-Tamoxifen. Die Dreifach-Mutation, ER^{T2}, führt zu einer 10-fach erhöhten Affinität zu Tamoxifen im Vergleich zu ER^T [98]. In Abwesenheit von Tamoxifen bindet das Cre-ER^{T2}-Fusionsprotein an ein Hitzeschockprotein (Hsp90), welches sich im Zytoplasma befindet und damit die DNA-Rekombination durch Cre verhindert [100]. In Gegenwart von Tamoxifen wird das Hsp90 freigesetzt, wodurch die Rekombinase nun durch Kernlokalisierungssignale in den Zellkern transportiert wird und die Rekombination stattfinden kann [101]. Insgesamt kann also durch die Gabe von Tamoxifen die Cre-Rekombination zu bestimmten Zeiten und Bedingungen gesteuert werden [102].

2.4 Aviäre Kokzidose in Hühnern

Die durch *Eimeria* verursachte aviäre Kokzidiose ist ein weltweites Problem der Geflügelindustrie. Sie verursacht schwere klinische Symptome bei Hühnern und führt gleichzeitig zu immensen wirtschaftlichen Verlusten [103]. Je nach Entwicklungsstadium der Kokzidien in den Enterozyten oder der Lamina propria treten Nekrosen, Kryptenatrophien, Läsionen und Blutungen am Darmepithel in unterschiedlichem Maße auf [104]. Dies führt bei den Hühnern zu Durchfall, verminderter Gewichtszunahme und reduzierter Eiproduktion sowie in schweren Fällen zum Tod [105]. *Eimerien* gehören zur

Gruppe der Protozoen. Es sind sieben *Eimeria* Spezies bei Hühnern beschrieben, die in der Lage sind Hühner zu infizieren. Diese unterscheiden sich in ihrer Vermehrung, Pathogenität und dem Ort der Vermehrung im Darm (siehe Abbildung 10) [106].

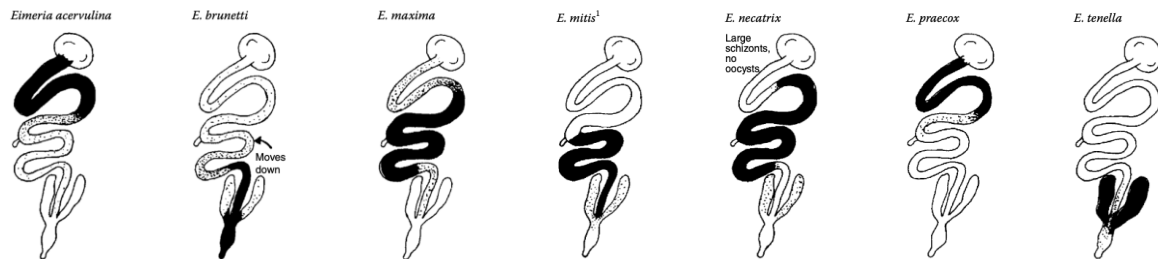


Abbildung 10: Ort der Vermehrung der *Eimeria*-Spezies. Es gibt sieben anerkannte *Eimeria*-Spezies, die infektiös für Hühner sind. Diese vermehren sich an unterschiedlichen Stellen im Darm, und führen hier zu Läsionen im Darmepithel. Die Spezies *Eimeria tenella* vermehrt sich im Caecum des Hühnerdarmes. Abbildung adaptiert aus [107].

Die Infektion erfolgt durch die Aufnahme unsporulierter Oozyten zum Beispiel mit dem Futter. Zunächst kommt es zur ungeschlechtlichen Vermehrung der *Eimerien*, der sogenannten Merogonie. Hierbei schlüpfen aus den Oozyten Sporozoiten, die daraufhin die Darmzellen der Hühner infizieren. Der Erreger teilt sich mehrmals, wodurch einkernige Merozoiten entstehen, die dann wiederum in neue Zellen eindringen und sich dort nochmals zu vermehren. Im nächsten Schritt dringt der Erreger in neue Zellen ein und differenziert sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten, sodass der zweite Teil des Zyklus die geschlechtliche Fortpflanzung stattfinden kann. Nach der Befruchtung des weiblichen Makrogameten, werden dann die Oozyten durch den Kot wieder ausgeschieden (siehe Abbildung 11) [107].

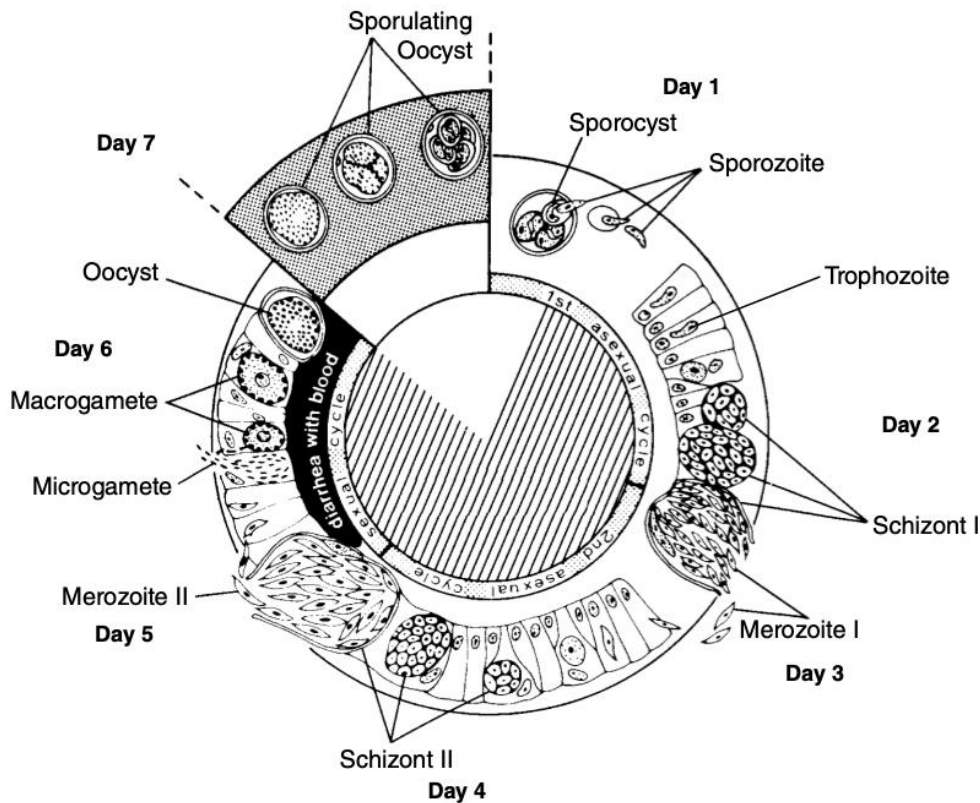


Abbildung 11: Lebenszyklus von Eimerien. Der Lebenszyklus von Eimerien dauert circa sieben Tage und besteht aus einem ungeschlechtlichen und einen geschlechtlichen Teil. Zunächst werden die Oozyten durch die Nahrung aufgenommen. Am Tag eins schlüpfen die Sporozysten aus den Oozyten. Am Tag zwei dringen diese in die Darmepithelien ein und teilen sich ungeschlechtlich zu Shizonten. Nach mehrmaliger Teilung bilden sich einkernige Merozoiten, die das Darmepithel rupturieren und neue Darmepithelzellen infizieren. Dieser Zyklus der Merozoiten Bildung wiederholt sich an Tag vier. Danach folgt die geschlechtliche Vermehrung der männlichen Mikrogameten und weiblichen Makrogameten, die zur Bildung von Oozyten führt, die wiederum am siebten Tag ausgeschieden werden. Abbildung übernommenen von [107].

Es ist allgemein anerkannt, dass eine Primärinfektion mit *Eimeria* zur Entwicklung einer starken Immunität bei Hühnern führt. Allerdings ist diese Immunität immer nur gegen eine Spezies gerichtet, was eine generelle Impfung gegen alle Spezies herausfordernd macht. Die zugrunde liegenden Immunmechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass T-Zell-vermittelte Immunreaktionen für die Eliminierung des Parasiten wesentlich sind [103, 108]. *Eimeria*-Infektionsexperimente in T-Zell-Knockout-Mäusen konnten bereits die Beteiligung von sowohl $\alpha\beta$ als auch $\gamma\delta$ T-Zellen in der Infektionsabwehr und Immunität gegen Kokzidien zeigen. So zeigten $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine höhere Anfälligkeit für *Eimeria*-Infektionen. Jedoch waren $\text{TCR}\delta^{-/-}$ Mäuse nicht anfälliger für die Infektion mit Protozoen, sondern zeigten bei der Infektion schwere pathologische Veränderungen der Schleimhautmorphologie [109, 110]. Mäuse sind allerdings nicht der natürliche Wirt für den Erreger. Die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn als Vertreter der darmassoziierten lymphatischen Gewebespezies (wie

Kaninchen und Schaf) und die physiologische Bedeutung der hohen Abundanz dieser T-Zellpopulation sind jedoch aktuell noch nicht geklärt.

2.5 Adoptive Transfersysteme

Adoptive Zelltransfersysteme dienen der Übertragung von Gewebe oder Zellen von einem Spender zu einem Empfänger. In Mensch und Maus sind diese Systeme schon sehr gut erforscht und werden nicht nur für die Basisforschung eingesetzt, um Funktionen, Interaktionen und Migrationen von bestimmten Zellpopulationen zu analysieren, sondern mittlerweile bereits in der Humantherapie zur Krebsbehandlung [111].

Im Huhn wurden bereits einige adoptive Transferexperimente durchgeführt. So konnten Rose et.al (1982) zeigen, dass der Transfer von Milzzellen und peripheren Blutlymphozyten von immunisierten Hühnern dazu führte, dass die Infektion mit *Eimeria maxima* signifikant reduziert wurde [112]. Der Transfer von Lymphozyten nach Immunisierung mit IBV führte zum Schutz vor IBV-Infektion in Hühnern [113]. Laparidou et al. (2020) konnten zeigen, dass nicht nur transferierte B-Zellen in BCR^{neg} Embryos in die Bursa einwandern, sondern auch das die Blockierung des CXCR4-Rezeptors zur verminderten Einwanderung der B-Zellen in die Bursa führt [114]. Beim Transfer von geprimten Lymphozyten aus adulten Hühnern in Ein-Tages-Küken, konnte gezeigt werden, dass die Küken durch den Transfer resistent gegenüber der Influenzainfektion waren. Dieser Effekt konnte allerdings nicht auf eine bestimmte Subpopulation zurückgeführt werden, da Gesamtlymphozyten transferiert wurden [115]. Um die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in der MDV-Infektion zu untersuchen, wurden PBMCs mit zuvor aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen in infizierte Hühner injiziert, wodurch die Viruslast in den Hühnern verringert wurde [116]. Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen eine bestimmte Subpopulation, wie z.B. die T-Zellen allein zu transferieren. Ebenfalls wurde bisher noch nie versucht markierte Zellen zu transferieren, um diese nach dem Transfer zu verfolgen.

2.5.1 Der Hauptkompatibilitätskomplex im Huhn

Eine MHC-Kompatibilität ist entscheidend für den Erfolg beim Zelltransfer [117]. Bei Vögeln sowie auch bei Säugetieren gibt es zwei MHC-Klassen, die bei der Antigenpräsentation in der Immunantwort eine Rolle spielen. MHC-Klasse I kommen auf

jeder kernhaltigen Zelle vor, binden Peptide aus dem Zytoplasma und präsentieren diese für CD8⁺ T-Zellen, wodurch diese aktiviert werden [118]. MHC-Klasse II kommt auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) vor und präsentiert Antigene, die von CD4⁺ T-Zellen gebunden werden woraufhin die humorale Immunabwehr aktiviert wird [17].

Die klassischen MHC-Moleküle variieren an vielen Aminosäurepositionen, sodass ein hoher Polymorphismus entsteht. Durch diesen Polymorphismus können möglichst viele verschiedene Antigene erkannt und präsentiert werden, wodurch Escape-Mechanismen von Viren und Bakterien umgangen werden können [16, 118]. In Hühnern ist der genomische B-Locus auf Chromosom 16 nicht nur für serologische Blutgruppen zuständig, sondern teilt auch viele Gemeinsamkeiten mit Genen, die in Säugetieren für den MHC kodieren (siehe Abbildung 12). Vor allem die BG-Region und die BF-BL-Region erkennen blutgruppenspezifische Antikörper in Hühnern. Gleichzeitig beinhaltet die BF-BL-Region Gene die für MHC-Klasse I und MHC-Klasse II kodieren [119]. Mithilfe des sogenannten MHC-Typings ist es möglich bestimmte MHC-Haplotypen in Hühnern zu identifizieren. Dieser Technik konnte bereits zeigen, dass Hühner mit dem MHC-Haplotypen B15 und B21 resistenter gegen MDV sind als andere Haplotypen [120].

The B locus

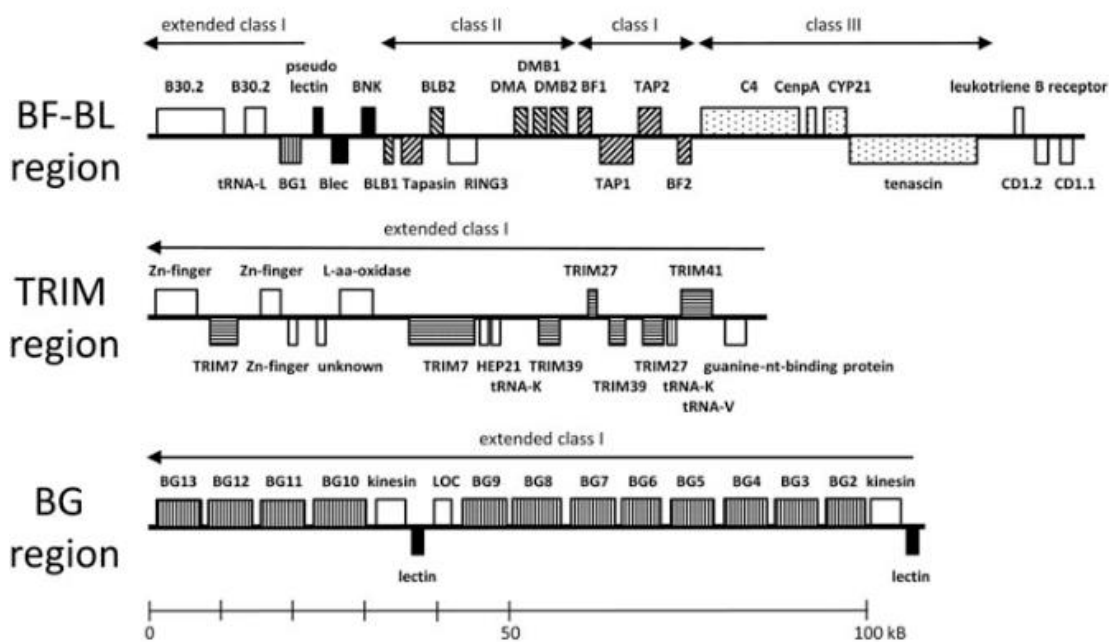


Abbildung 12: Der B-Locus im Hühnergenom. Der B-Locus ist eine Gensequenz, die für die Hühner MHC Moleküle codieren. Er wird eingeteilt in BF-BL-Region, TRIM-Region und BG-Region. Wobei einzig die BF-BL Region für MHC Klasse I und II kodiert. Die TRIM und BG-Region sind gehören zur erweiterten Klasse I-Region. Abbildung übernommen aus [17].

3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es die Rolle der T-Zell-Subpopulationen in der Immunantwort von Hühnern zu analysieren. Hierfür wird der Phänotyp von Hühnern charakterisiert, die einen Knockout in der konstanten Region der TCR β -Kette besitzen. Darüber hinaus soll die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Infektionsabwehr und Immunität analysiert werden, durch ein *Eimeria tenella* Challenge-Experiment der TCR $C\gamma$ Knockout-Hühner. Anschließend soll ein adoptives Transfersystem etabliert, um die Rolle der T-Zellen in der Immunantwort von Hühnern mithilfe von mCherry⁺-exprimierenden Zellen zu untersuchen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es Cre-ER^{T2}-Chimären und eine loxP TCR C β ^{KI}-Keimzelllinie für einen induzierbaren $\alpha\beta$ T-Zell-Knockout zu generieren.

4 Material

4.1 Geräte und Ausrüstung

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Herstellerinformation

Instrument	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Anaerobiertopf	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Attune Nxt Flow Cytometer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Attune Nxt Autosampler	Invitrogen, Carlsbad, USA
Biochrom Fluido 2	Fisher Scientific, Schwerte, GER
Mikrotiterplatten-Waschgerät	
BTX ECM 830 Elektroporator	BTX, Holliston, USA
CO ₂ -Inkubator HERACell Vios 160i,	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Steri-Cycle CO ₂ Inkubator für die Zellkultur	
CoolCell® Einfrierbox, Abkühlen der Zellen auf – 1 °C/min	BioCision, San Rafael, USA
Cytoflex SRT	Beckmann Coulter, Indianapolis, USA
Digitaler Heizblock	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
DREMEL® 3000-15	Conrad GmbH, München, GER
Echo Discover Mikroskop	Echo Laboratories Inc., San Diego, USA
Eierinkubator HEKA Favorit Olymp	HEKA-Brutgeräte, Rietberg, GER
Eierinkubator Procon BSS	Grumbach Brutgeräte GmbH, Aßlar, GER
Einbettssystem HistoCore Arcadia	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
Eismaschine	Eurfrigor, Lainate, ITAL
Färbekasten Histologie	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Feinwaage 440-33N	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, GER
Feuchtkammer	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Beloeil, CAN
FluoSTAR Omega	BMG Labtech, Ortenberg, GER
Gefrierschrank (-20 °C), GNP3056	Liebherr, Biberach, GER
Gefrierschrank (-80 °C), SN30407588	Thermo Scientific, Waltham, USA

Gel-Dokumentationskammer, Quatum ST5	Viber Lourmat, Eberhardzell, GER
Gelkamm 6-12 Taschen	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
Gelkammer	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
Gelschlitten, Thermo EC Classis CSSU911	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gewebe-Homogenisator (Speed Mill Plus)	Analytik Jena GmbH, Darmstadt, GER
Gewebeinfiltrationsautomat Leica TP1020	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
Glasflaschen	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Glaskugeln $\pm 0,3$ mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER
Glasware (Becher, Erlenmeyerkolben)	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Inkubator Series BD Classic Line	Binder GmbH, Tuttlingen, GER
Inkubator Mikroplatten Shaker	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Kryotom CyroStar™ NX70	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank (4 °C), TP410 Comfort	Liebherr, Biberach, GER
MAC Master Oozyten Zählkammer	Jorgensen Laboratories, LLC, Loveland, USA
MACS-Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER
Magnetischer Rührfisch	VELP Scientifica, Usmate, ITA
Magnetrührer VMS Advanced	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Mikroplatten-Schüttel-Inkubator	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Mikroskop DM IL LED	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Mikrowelle	MDA, Rüsselsheim, GER
Mikrozentrifuge, MiniStar	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Multikanal-Pipette -P10 (P12X10L), P200 (P12x200L)	Gilson Inc, Middleton, USA
Multipette®-Mehrfachdispenser- Pipette	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Neubauer Zählkammer (Faktor 10 ⁵)	Laboroptik Ltd, Lancing, UK

Orbital Schüttler, Standard Analog-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
PCR Cycler, Multicycler PTC 220, Dyad DNA Engine	Bio-Rad Laboratories, München, GER
PCR Cycler, peqStar 2x	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
PCR Cycler, T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München, GER
PCR-Station Pro HEPA	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
pH-Meter CyberScan 510	EUtech Scientific, Aachen, GER
Pipette P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Inc, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, München, GER
Precipoint Mikroskop	PreciPoint GmbH, Freising, GER
QuatStudio 5, Real-Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QX200TM Digital Droplet PCR (ddPCR) Generator	Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany
QX200TM Digital Droplet PCR (ddPCR) Reader	Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany
Schierlampe LED Schierlampe Powerlux	Siepmann GmbH, Herdecke, GER
SpeedMil PLUS	Analytik Jena, Jena, GER
Spektrophotometer, NanoDrop™ Lite	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile chirurgische Instrumente (Schere, Pinzetten)	Henry Schein VET GmbH, Hamburg, GER
Sterile Werkbank, HeraSafe H12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, GER
Stromgerät für die Gelkammer, PowerPac, Basic	Bio-Rad Laboratories, München, GER
Thermoschüttler	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Universalschüttler SM30 A control	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, GER
Vakuumpumpe CVC2000	Vacuumbrand, Wertheim, GER

Vortex Mixer, ZX3 Advanced Vortex Mixer	VELP Scientifica™, Usmate, ITA
Waage	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, GER
Zentrifuge 4-16KS	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge 5424R	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge 5810R	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge Minispin® F-45-12-11	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge SIGMA 4K15CH	SciQuip Ltd, Newtown, UK

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerinformation

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aluminiumfolie	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Autoklavierbare Abfalltüten	Ratiolab, Dreieich, GER
Biopsie Einbettkassetten Swingsette™	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Biosphere® Filterspitzen 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 2-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 2-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 2-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Combitips advanced® Eppendorf	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
EDTA Mikrovetten Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Einmal Wischtücher KIMTECH	Carl Roth GmbH, Darmstadt, GER
Elektroporationsküvetten	Lonza Cologne GmbH, Köln, GER
Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
FACS-Tube, Deckel mit Zellfilter-Einheit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

FACS-Tube, Deckel ohne Zellfilter-Einheit	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Falcon (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Falcon (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Feather [®] C35 Mikrotom-Klinge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hautbiopsiestanzen 5mm	MarMed GmbH, Cölbe, GER
Injekt [®] -F Luer Solo 0,0 1-1 ml	B. Braun, Meisungen, GER
Injekt [®] -F Luer Solo 10 ml	B. Braun, Meisungen, GER
Injekt [®] -F Luer Solo 5 ml	B. Braun, Meisungen, GER
InnuSpeed Lysis Tube A	Analytik Jena GmbH, Jena, GER
Insulin Nadeln	BD Medical, New Jersey, USA
Kanülen (27 – 20 G)	B. Braun Melsungen AG, Hessen, GER
Klebeband	Thermo Fisher Scientific, Waltham, GER
Küvetten	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
LS-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, GER
MegaBlock [®] 96 well, 1,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Mikrotiter-Platte (96 Well), unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Multiply [®] -µStrip Pro 8-Strip	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Nitril [®] BestGen [®] (puder- und latex-freie Handschuhe, Größe M)	Meditrade, Kiefersfelden, GER
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare Life Science, Amersham, UK
Nunc [™] Kryotube Vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc [™] EasYFlask [™] 25 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc [™] EasYFlask [™] 75 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc [™] Delta Surface, 12 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc [™] Delta Surface, 24 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc [™] Delta Surface, 48 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc [™] Delta Surface, 96 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc Maxisorb Immunoplate, 96 well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Ohio, USA
PCR-Folie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, GER

PCR-Platte, 96 PCR Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
PCR-Tube	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Peel-away Schälchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischalen, steril	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischalen, unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Reagens Reservoir (50 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Reagenzbehälter	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Sterile chirurgische Klinge	C. Bruno Bayha, Tuttlingen, GER
Sterilfilter 0,22 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuum-Filtereinheit	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wägeschiffchen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, GER
Zellstrainer (Siebgröße 100µm)	Sigma Aldrich, Darmstadt, GER

4.3 Verwendete Hühnerlinien, Zellen, Bakterien und Erreger

Tabelle 3: Verwendete Hühnerlinien

Hühner-Linie	Ursprung	Verwendung
Lohmann's selected Leghorn Classic (LSL)	LOHMANN Deutschland GmbH&Co KG, Ankum, GER	Hühnerlinie für die Zucht, für die PGC-Isolierung, Generierung der Cre-ER ^{T2} - Chimären
TCR C β KO-Hühner	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER	Phänotypische Charakterisierung, adoptive Transfer-Experimente
TCR C γ KO-Hühner	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER	Infektions- und Challenge- Experiment mit <i>Eimeria tenella</i> , adoptive Transfer Experiment

mCherry ⁺ - Hühner	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER	adoptive Transfer-Experimente
----------------------------------	---	-------------------------------

Tabelle 4: Verwendete Zellen in der Zellkultur

Zelltyp	Genotyp	Bezugsquelle
PGC	WT, Cre ER ^{T2} , loxP TCR C β ^{KI}	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER

Tabelle 5: Verwendete Bakterien

Bakterien	Stamm	Subtyp	Bezugsquelle
DH5 α kompetente <i>E. Coli</i>	K12 Stamm	DH5 α	Selbst hergestellt, Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER

Tabelle 6: Verwendete Erreger

Name	Erreger	Stamm	Pathogenität	Bezugsquelle
<i>Eimeria tenella</i>	<i>E. Tenella</i>	Alveolata	hochpathogen	INRAE, Nouzilly, France

4.4 Chemikalien

4.4.1 Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 7: Verwendete Zusätze für die Zellkultur mit Herstellerinformationen

Zellkulturmedien/ Zusätze	Hersteller
Activin A	PeproTech GmbH, Hamburg, GER
Anaerocult A	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Avian Knock-out Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
CO ₂ independent Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO [(CH ₃) ₂ SO] ₂	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose mit 4500 mg/ml Glucose, Natriumpyruvat, Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin, flüssig, steril-filtriert	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Fetales Kälberserum (FBS) Superior	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER

Fibroblast-Growth-Factor (FGF)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Glutamaxx (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SUA
Hühner-Serum (chSerum)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hygromycin B	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Kaliumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Nicht essenzielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nukleotide (100 mM)	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
OptiMEM™	Gibco™, Waltham, USA
Ovalbumin	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Pyruvat (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 Medium mit Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin, flüssig, steril-filtriert	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Trypan BlueMGSO	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Biochrom GmbH, Berlin, GER

4.4.2 Verwendete Zusätze für die molekularbiologischen Methoden

Tabelle 8: Verwendete Zusätze in der Molekularbiologie mit Herstellerinformationen

Chemikalien	Hersteller
100% EtOH für Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Agarose low EEO	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Ampicillin Salz	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Borsäure (H ₃ BO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
DNA-Leiter 1 kb Plus	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER

Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Heparin-Natrium-25.000 I.E.	Ratiopharm, Ulm, GER
Histopaque 1077	Sigma Aldrich, Darmstadt, GER
IC-Fixierungslösung	T Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Lysogeny Broth (LB)-Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
LB Medium Pulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Magnesiumsulfatlösung (MgSO ₄)	INRAE, Tours France
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Nuklease-freies H ₂ O	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Orange G	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Paraffinöl	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
PeqGREEN	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
Permeabilisierungslösung 10X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNA-later	Sigma Aldrich, Darmstadt, GER
RPMI-Flüssigmedium mit 2,0 g/L NaHCO ₃ , ohne L Glutamin	Sigma Aldrich, Darmstadt, GER
Saccharose	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Thioglycerol	Promega™, Madison, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-HCl) (C ₄ H ₁₁ NO ₃ xHCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Trypsin aus Schweinepankreas	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Trypton-Soja-Agar	Merck KGaK, Darmstadt, GER
Tween20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER

4.4.3 Verwendete Zusätze für die Histologie

Tabelle 9: Verwendete Zusätze für die Histologie mit Herstellerinformation

Chemikalien	Hersteller
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
DAPI	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Eosin	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, GER
Ethanol	CLN GmbH, Niederhummel, GER
Isopropylalkohol	CLN GmbH, Niederhummel, GER
Flüssiger Stickstoff	Westfalen AG, Münster, GER
Mausserum	Jackson ImmunoResearch, Cambridshire, UK
Mayer's Hämatoxylin	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, GER
O.C.T. Tissue Tek	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trockeneis	Trockeneis Direkt, Willingen, GER
Vectamount Express	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, GER
Mounting-Medium	
Vectashield Mounting-Medium	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, GER
Xylol	CLN GmbH, Niederhummel, GER
Ziegen Serum	Jackson ImmunoResearch, Cambridshire, UK

4.5 Zellkultur-Medien

4.5.1 Manipulation-Medium

Tabelle 10: Manipulation-Medium

Bestandteile	Volumen
CO ₂ independet Medium	500 ml
FBS	56 ml
Glutamaxx	5,6 ml
Pen/Strep	5,6 ml
Gesamtvolumen	567,2 ml

Nach der Herstellung wurde das Medium mithilfe eines 0,2µm Vakuum-Sterilfilters entgast und in 50mL Aliquots aufgeteilt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.5.2 PGC-Medium

Tabelle 11: PGC-Medium

Bestandteile	Volumen
Avian Knock-out Dulbecco's Modified Eagle's Medium	46,225 ml
Supplement (50x)	1 ml
Glutamaxx (100x)	0,5 ml
NEAA (100x)	0,5 ml
Nukleotide (100 mM)	0,5 ml
Pyruvat (100x)	0,2 ml
β-Mercaptoethanol (50 mM)	0,1 ml
Pen/Strep (100x, optional)	0,1 ml
CaCl ₂ (20 mM)	0,375 ml
Ovalbumin (20 %)	0,5 ml
Heparin Sulfat (50 mg/ml)	0,1 ml
Gesamtvolumen	50 ml

Nach der Herstellung wurde das Medium mithilfe eines 0,2µm Vakuum-Sterilfilters entgast. Ein 50ml PGC-Medium Aliquot wurde kurz vor Gebrauch noch mit 100 µl chSerum, 25 µl Activin A und 20µl FGF gemischt. Für den Sort wurde dem PGC-Medium außerdem Pen/Strep (2 µl/ml PGC-Medium) zugesetzt. Das Medium wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.5.3 Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS)

Table 12: PBS

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄	5,75 g
KCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 5 L

Der pH wurde auf 7,2 mit 1M Salzsäure (HCl) und 1M Natronlauge (NaOH) eingestellt und die Lösung für den Gebrauch in der Zellkultur autoklaviert.

4.5.4 Hygromycin B-Stammlösung

Table 13: Hygromycin-Stammlösung

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Hygromycin B	41,2 mg
Nuklease-freies H ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 ml

Die Lösung wurde in 100µL Aliquots aufgeteilt und auf 4°C gelagert.

4.6 Molekularbiologische Puffer

4.6.1 PBS-T

Table 14: PBS-T

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄	5,75 g
KCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Tween20	2,5 ml
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 5 L

Der pH wurde auf 7,2 mit 1M Salzsäure (HCl) und 1M Natronlauge (NaOH) eingestellt und der Puffer bei Raumtemperatur gelagert.

4.6.2 PBS + 1% Bovines Serum Albumin (BSA)

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
PBS (pH7,2)	49,5mL
BSA	0,5mL

Der Puffer wurde im Kühlschrank auf 4°C gelagert.

4.6.3 Saccharose-Tris-Magnesiumchlorid (STM) Puffer

Table 15: STM-Puffer

Bestandteile	Molare Masse/ Prozent
Saccharose	64 mM
Tris Cl, pH 7,5	20 mM
MgCl ₂	10 mM
Triton™ X-100	0,5 %

Der Puffer wurde in 50ml Aliquots im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

4.6.4 Tris-EDTA-Natriumchlorid (TEN) Puffer

Table 16: TEN Puffer

Bestandteile	Molare Masse
Tris Cl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	10 mM

4.6.5 Pronase E-Stammlösung

Table 17: Pronase E-Stammlösung

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Pronase E	20 mg
H ₂ O	1 ml

Die Pronase E wurde in 100mL Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Pronase E stammt aus *Streptomyces griseus*.

4.6.6 Tissue-Lysis-Buffer

Tabelle 18: Tissue-Lysis-Buffer

Bestandteile	molare Masse/ Prozent
SDS	0,2%
EDTA	5 mM
Tris HCl pH 8,5	100 mM
NaCl	200 mM

4.6.7 10X Trisborat mit EDTA-Puffer (TBE)

Tabelle 19: TBE -Puffer

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Tris	242 g
0.5 M EDTA	100 ml
CH ₃ COOH	57.1 ml
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

Der Puffer wurde für die Gelelektrophorese im Verhältnis 1:10 (200 ml Stock Solution + 1,8 L H₂O) verdünnt.

4.6.8 6x Orange G DNA-Loading Dye

Tabelle 20: 6X Orange G DNA-Loading Dye

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Glycerol	60ml
0.5 M EDTA	12ml
6x Orange G	100mg
dH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 100 ml

4.6.9 DNA 1kp plus Ladder

Tabelle 21: DNA 1kp plus Ladder

Bestandteile	Volumen
DNA Leiter 1kb Plus	4,5 µl
6x Orange G	25 µl
Nuclease-freies H ₂ O	120,5 µl

4.6.10 Fluobuffer

Tabelle 22: Fluobuffer

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
PBS (pH 7,2)	500 mL
Albumin Fraction V (BSA)	5g
Natrium Azid (NaN ₃)	50mg

Der Puffer wurde auf 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.6.11 Separation-Buffer

Tabelle 23: Separation- Buffer

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
PBS (pH 7,2)	100mL
EDTA	400µL
Albumin Fraction V (BSA)	0,5g

Nach der Herstellung wurde der Puffer mithilfe eines 0,2µm Vakuum-Sterilfilters entgast und bei 4°C gelagert.

4.6.12 Labeling-Buffer

Tabelle 24: Labeling-Buffer

Bestandteile	Volumen
PBS (pH 7,2)	50mL
EDTA	200µL

Nach der Herstellung wurde der Puffer mithilfe eines 0,2µm Vakuum-Sterilfilters entgast und bei 4°C gelagert.

4.6.13 Coating-Buffer

Table 25: Coating-Buffer

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Di-Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	3,11g
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	6g
Destilliertes Wasser (dH_2O)	1L

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

4.6.14 Tetramethylbenzidin (TMB)-Buffer

Table 26: TMB-Buffer

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Wasserfreies Natriumacetat (CH_3COONa)	4,9g
Zitronensäure 1-Hydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	3,15g
Doppel-destilliertes Wasser (ddH_2O)	1L

Der pH des Puffers wurde auf 5,0 mit 1M HCl und 1M NaOH eingestellt und bei 4°C gelagert.

4.6.15 TMB-Stammlösung

Table 27: TMB-Stammlösung

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Tetramethylbenzidin (TMB)	6mg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1mL

Die Stammlösung wurde im dunklen, für bis zu einer Woche, bei Raumtemperatur gelagert.

4.6.16 TMB-Arbeitslösung

Table 28: TMB-Arbeitslösung

Bestandteile	Volumen
TMB-Puffer	10mL
TMB-Stammlösung	332 μL
Hydrogenperoxid (H_2O_2)	3 μL

Die Lösung wurde frisch vor Gebrauch hergestellt.

4.6.17 4%ige Magermilch

Tabelle 29: 4%ige Magermilch

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Fettfreies Trockenmilchpulver	1,2g
PBS	30mL

Die Lösung wurde auf 4°C gelagert.

4.6.18 1,5% Trypsin-Lösung

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Trypsin	0,75 g
PBS	50mL

4.6.19 4% Paraformaldehyd (PFA) -Lösung

Tabelle 30:4% PFA-Lösung

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
PFA	20g
ddH ₂ O	450ml
NaOH	Einige Tropfen
10X PBS	50ml

Das PFA wurde 1 Stunde bei 60°C in ddH₂O gerührt, erst nach vollständigem Auflösen wurde NaOH und 10X PBS hinzugefügt.

4.7 Bakterien und Klonierung

4.7.1 Luria-Bertani (LB)-Medium

Tabelle 31: LB-Medium

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
LB-Medium Pulver	25g
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 1L

Die Lösung wurde unmittelbar nach Herstellung autoklaviert und auf 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.7.2 LB-Agar

Tabelle 32: LB-Agar

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
LB-Agar Pulver	40g
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 1L

Die Lösung wurde unmittelbar nach Herstellung autoklaviert und auf 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde die Lösung in der Mikrowelle erwärmt, 1000µL Ampicillin-Stammlösung hinzugefügt und in Petrischalen ausgegossen. Die Platten wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.7.3 Trypton-Soya-Agar

Tabelle 33: Trypton-Soya-Agar

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Trypton-Soya-Agar	40g
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 1L

Die Lösung wurde unmittelbar nach Herstellung autoklaviert und auf 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Herstellung der Agar-Platten wurde die Lösung in der Mikrowelle erwärmt und in Petrischalen ausgegossen. Die Platten wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.7.4 Ampicillin-Stammlösung

Tabelle 34: Ampicillin-Stammlösung

Bestandteile	Volumen/ Gewicht
Ampicillin Salz	1g
ddH ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 10mL

Die Lösung wurde daraufhin sterilfiltriert, in 1mL Aliquots aufgeteilt und auf -20°C gekühlt gelagert.

4.8 Enzyme und Polymerasen

4.8.1 Enzyme und Puffer

Tabella 35: Enzyme und Puffer mit Herstellerinformation

Enzym/Puffer	Hersteller
AhdI	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
Adenosintriphosphat (ATP) (10mM)	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
Bsal	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
BshTI	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
CuSmart Puffer	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
DNaseI	Promega™, Madison, USA
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
NhdI-HF	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
PlasmidSafe Buffer 10X	Lucigen Corporation, Middleton, USA
Plasmidsafe ATP-dependend DNase	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
Pronase E	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Tango Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T7 DNA Ligase	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
XbaI	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA

4.8.2 Polymerasen

Tabelle 36: Polymerasen mit Herstellerinformation

Polymerase	Hersteller
FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	Solis BioDyne, Tartu, Estland
HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	Solis BioDyne, Tartu, Estland

4.9 Antikörper

4.9.1 FACS-Antikörper

Tabelle 37: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie

Primärantikörper				
Antikörper	Interne Nummer	Hersteller	Klon	Konzentration
Fixable Viability Dye eFlour	#13	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	-	1:1000
mouse anti-chicken CD8a_PacBlue	#60	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	CT-8	0,625 µg/mL
mouse anti-chicken CD8β_UNLAB	#61	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	EP42	0,625 µg/mL
mouse anti-chicken CD4_FITC	#59	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	CT-4	0,625 µg/mL
mouse anti-chicken TCRgd-BIOT	#42	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	TCR-1	0,625 µg/mL
mouse anti-chicken TCRab/Vb1-BIOT	#43	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	TCR-2	2,5µg/mL
mouse anti-chicken TCRab/Vb2-BIOT	#44	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	TCR-3	2,5µg/mL
mouse anti-chicken Bu1-FITC	#25	BIOZOL Diagnostica	AV-20	2,5µg/mL

			Vertrieb GmbH, Eching GER		
mouse anti- chicken KUL01	#23	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	KUL01	0,625 µg/mL	
Mouse anti-chicken TCRgd-FITC	#144	Southern Biotech, Birmingham, USA	TCR1	1,25µg/mL	
Mouse anti-chicken TCR. ab/Vb1-FITC	#129	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	TCR2	2,5µg/mL	
Mouse anti-chicken TCR. ab/Vb2-FITC	#130	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	TCR3	1,25µg/mL	
Human anti-chicken CD25-FITC	#114	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA	AbD13504	2,5µg/mL	
Mouse Anti-chicken CD28-UNLB	#119	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	AV7	2,5µg/mL	
Mouse Anti-Human CD57- BV421	#115	BD Horizon	NK-1		
Mouse Anti-chicken MHC Class II - AF488	#118	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	2G11	0,5µg/mL	
Perforin 1 (F-1) FITC	#122	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dalls, USA	F-1	1µg/mL	
anti mouse Granzyme A -PE	#121	BIOLEGEND, San Diego, USA	3G8.5	1µg/mL	

Tabelle 38: Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Sekundärantikörper				
Antikörper	Interne Nummer	Hersteller	Klon	Konzentration
rat anti- mouse IgG2a_PE	#62	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	SB84a	0,125µg/mL
Streptavidin-APC	#45	VWR International GmbH, Darmstadt, GER	-	0,2µg/mL

goat anti-mouse IgG (H+L)-APC	#26	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	polyclonal	0,625 µg/mL
-------------------------------	-----	--	------------	-------------

Tabelle 39: Verwendete MicroBeads

Beads	Hersteller
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER

4.9.2 Histologie-Antikörper

Tabelle 40: Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Interne Nummer	Hersteller	Klon	Konzentration
mouse anti-chicken TCR1	#18	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	TCR-1	2,5µg/mL
mouse anti-chicken GRL1	#5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA	GRL-1	0,60µg/mL
Mouse anti-chicken Bu1	#21	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	AV-20	5µg/mL
Mouse anti-chicken KUL01	#23	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	KUL01	5µg/mL

Tabelle 41: Antikörper für die Fluoreszenzhistologie

Antikörper	Interne Nummer	Hersteller	Klon	Konzentration
CD4-UNLB	#16	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	CT-4	0,01mg/mL
CD8a-UNLB	#17	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	CT-8	5µg/mL
Bu-1-FITC	#25	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	AV-20	5µg/mL
anti-mouse-IgG-AF568	#9	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER	polyclonal	0,01mg/mL

4.9.3 Enzym -Linked Immunosobent Assay (ELISA)-Antikörper

Tabelle 42: ELISA-Antikörper

Antikörper	Interne Nummer	Hersteller	Klon	Konzentration
Mouse anti-chicken IgA-UNLB	#67	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER	A-1	2µg/mL
Rabbit anti-chicken IgY	#100	Jackson ImmunoResearch, Cambridshire, UK	polyclonal	2µg/mL
Goat anti-chicken IgM	#29	Biomol GmbH, Hamburg, GER	polyclonal	2µg/mL
Goat anti-chicken IgA-HRP	#68	Biomol GmbH, Hamburg, GER	polyclonal	0,1ng/mL
Goat anti-chicken IgM-HRP	#12	Biomol GmbH, Hamburg, GER	polyclonal	0,05ng/mL
Rabbit anti-chicken IgY-HRP	#101	Jackson ImmunoResearch, Cambridshire, UK	polyclonal	0,02µg/mL

4.10 Kits

Tabelle 43: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Agilent RNA 6.000 Nano Kit	Agilent, Santa Clara, USA
AMAXA™ Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza Cologne GmbH, Köln, GER
GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers	Promega™, Madison, USA
GoTaq qPCR Master Mix Kit	Promega™, Madison, USA
Mix2Seq ON Kit	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, GER
PureYield™ Plasmid MidiPrep System	Promega™, Madison, USA
PureYield™ Plasmid MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
ReliaPrep™ Blood gDNA MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep System	Promega™, Madison, USA

ReliaPrep™ RNA Tissue MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
Vectastain ABC Peroxidase Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER
Vector DAB Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching GER
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up Systems	Promega™, Madison, USA

4.11 Primer und Oligonukleotide

4.11.1 Primer

Tabelle 44: Verwendete Primer für die Geschlechtsbestimmung, Genotypisierung und MHC-Haplotypisierung und Sequencing

Primer	Interne Nummer	Sequenz von 5' nach 3'	Annealing Temp (°C)	Amplikon (bp)
Z Chromosom Forward	1	AAGCATAGAAACAATGTGGGAC	56	250
Z Chromosom Reverse	2	AACTCTGTCTGGAAGGACTT	56	250
W Chromosom Forward	3	CTATGCCTACCACMTCCTATTT GC	56	375
W Chromosom Reverse	4	AGCTGGAYTTCAGWSCATCTTCT	56	375
TCR C γ KO Loop out Region Forward	121	GCCATTCCTATTCCCATCCTAAG T	60	676
TCR C γ KO Loop out Region Reverse	223	GGTTCGAAATGACCGACCAAG C	60	676
WT TCR C γ Region Forward	59	CAGCTCCACGCCATGAAACCAT AG	60	384
WT TCR C γ Region Reverse	35	GTTGTCACTGTCACTGGCTG	60	384
TCR C β KO Loop out	426	GGCTTGACACTCAGCTCTATA G	58	679 313

Region Forward WT TCR C β				
Region Forward TCR C β KO	223	GAGCAGATGAGGAGCTGCCAG C	58	679
Loop out Region Reverse WT TCR	1172	CACACCATTACCTTCCAGAC	58	313
C β Region Reverse MHC	1376	CACGCAGCAGAACTTGGTAAG G	61	250/350/>5 00
Microsatelite Forward MHC Microsat elite Reverse	1377	AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC	61	250/350/>5 00
MHC Haplotyp B9 Forward	1378	GTGGACGGGGA ACTCTTCAC	60	-
MHC Haplotyp B9 Reverse	1379	CTGTGCGATCTGCGTCTGT	60	-
MHC Haplotyp B15 Forward	1382	TCCGGGGGTATAGTCAGGAT	60	<200
MHC Haplotyp B15 Reverse	1383	CTGCTTCAGCCCCTCAGCATA	60	<200
MHC Haplotyp B21 Forward	1384	TCCGGGGGTATCATCAGGCA	63	<300
MHC Haplotyp B21 Reverse	1385	CAGCCCCTCAGCATAACCTC	63	<300
MHC Haplotyp B43 Forward	1386	TGACATTCTCGAGGACGGCA	60	-
MHC Haplotyp B43 Reverse	1387	CCACCTCTCAGGTTCACTCT	60	-
Cre Forward	196	GCATTACCGGTCGATGCAACG	63	679
Cre Reverse	197	ACAGGTAGTTATTCGGATCATC	63	679

loxP TCR C β ^{KI} Forward	548	ATATTGCACCCAGATCTGGGG C	57	1154
loxP TCR C β ^{KI} Reverse	1690	CGAAGTTATGAGGGTGAGAGA AAG	57	1154
Sequencing Primer DA 15119	237	GTACCCCATTTGTCTGCAG	-	-

Tabelle 45: ddPCR Primer

Primer	Interne Nummer	Sequenz von 5' nach 3'	Annealing Temp (°C)
Beta-actin Forward	491	CAGGATGCAGAAGGAGATCA	59
Beta-actin Reverse	492	TCCACCACTAAGACAAAGCA	59
Beta-actin Probe (5'HEX 3' BHQ1)	500	GTGGGTGGAGGAGGCTGAGC	66
Hygromycin Forward	648	CATATGCGCGATTGCTGATC	57
Hygromycin Reverse	649	GTCAATGACCGCTGTTATGC	56
Hygromycin Probe (5'FAM3'BHQ1)	650	TCGTGCACGCGGATTCGGCTCCAA	70

Tabelle 46: qPCR-Primer

Primer	Sequenz 5' nach 3'	Schmelzpunkt T _m	Amplikonlänge (bp)	Quelle	Accession Nummer
FoxP3 sense	AGTACGCCACAACCTGAGCCT	59 °C	157	Adaptiert aus Burkhardt et al. 2022 [34]	MT133687.1
FoxP3 antisense	TTGGGGTCCTCTCAGCTCCGT	59 °C	157	Adaptiert aus Burkhardt et al. 2022 [34]	MT133687.1
IL13 sense	CTGCCCTTGCTCTCCTCTGT	59 °C	123	Adaptiert aus Liu et al. 2010 [121]	AJ621250.1

IL13 antisen se	CCTGCACTCCTCTGTTGAGCTT	59 °C	123	Adaptiert aus Liu et al. 2010 [121]	AJ621250.1
IL17A sense	TTTCTGCACATGGGAAGGTG	59 °C	144	Adaptiert aus Khampeerat huch et al. 2018 [122]	AJ493595
IL17A antisen se	CCTGGTTCATGTTGCTGATGC	59 °C	144	Adaptiert aus Khampeerat huch et al. 2018 [122]	AJ493595
IL22 sense	TGTTGTTGCTGTTCCCTCTTC	59 °C	143	Adaptiert aus Kim et al. 2012 [123]	NM_0011996 14.1
IL22 antisen se	GCCAAGGTGTAGGTGCGATTC C	59 °C	143	Adaptiert aus Yu et al. 2021 [124]	NM_0011996 14.1
IL4 sense	GTGCCACGCTGTGCTTAC	59 °C	82	Adaptiert aus Xu et al. 2015 [125]	AJ621249.
IL4 antisen se	AGGAAACCTCTCCCTGGATGT C	59 °C	82	Adaptiert aus Xu et al. 2015 [125]	AJ621249.
IL5 sense	GGAACGGCACTGTTGAAAAAT AA	59 °C	111	Adaptiert aus Liu et al. 2010 [121]	NM_0010070 84.2
IL5 antisen se	TTCTCCCTCTCCTGTCAGTTGT G	59 °C	111	Adaptiert aus Liu et al. 2010 [121]	NM_0010070 84.2
IL6 sense	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	59 °C	139	Übernomme n von Breithaupt 2011 [126]	NM_204628
IL6 antisen se	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA	59 °C	139	Übernomme n von Breithaupt 2011 [126]	NM_204628
TGFβ sense	CGGCCGACGATGAGTGGCTC	59 °C	120	Adaptiert aus Brisbin et al. 2010 [127]	M31160.1
TGFβ antisen se	CGGGGCCCATCTCACAGGGA	59 °C	120	Adaptiert aus Brisbin et al. 2010 [127]	M31160.1
TNFα sense	TGCTGTTCTATGACCGCC	59 °C	174	Adaptiert aus Farag et al. 2021 [128]	NM_204267. 2

TNF α antisen se	CTTTCAGAGCATCAACGCA	59 °C	174	Adaptiert aus Farag et al. 2021 [128]	NM_204267. 2
IFN γ sense	CACTGACAAGTCAAAGCCGCA C	59 °C	129	designed mit Benchling	NM_205149. 2
IFN γ antisen se	AAGTCGTTTCATCGGGAGCTTG G	59 °C	129	designed mit Benchling	NM_205149. 2
IL1 β sense	GTGAGGCTCAACATTGCGCTG TA	59 °C	214	Adaptiert aus Brisbin et al. 2010 [127]	NM_204524. 2
IL1 β antisen se	TGTCCAGGCGGTAGAAGATGA AG	59 °C	214	Adaptiert aus Brisbin et al. 2010 [127]	NM_204524. 2
r18S sense	CATGTCTAAGTACACACGGGC GGTA	59 °C	136	Übernomme n aus Laparidou et.al 2019 [114]	NC_052547.1
r18S antisen se	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA	59 °C	136	Übernomme n aus Laparidou et.al 2019 [114]	NC_052547.1

4.11.2 Oligonukleotide

Tabelle 47: verwendete Oligonukleotide

#	Sequenz	Target	Verwendung	Quelle
392	CACCGggtgaaaagatgaccacatc	TCR C β	sgRNA 1425	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER
393	AAACgatgtggtcatcttttcaccC	TCR C β	sgRNA 1425	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER

4.12 DNA-Vektoren und-Konstrukte

Tabelle 48: Verwendete Konstrukte

Konstrukt Name	Interne #	Antibiotika Resistenz	Quelle
Px333_eGFP_sgRNA1504	375	Ampicillin	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER
pBS-universal-loxP TCRbeta	469	-	Genewiz Inc., Leipzig, GER

Tabelle 49: generierte Konstrukte

Konstrukt Name	Interne #	Insert	Ursprüngliches Konstrukt	Primer für Sequenzierung
Px333_eGFP_sgRNA 1504_sgRNA1425	467	sgRNA 1425	Px333_eGFP_sgR NA1504	#237

4.13 Software und verwendete Online-Dienste

Tabelle 50: verwendete Software und Online-Dienste

Software	Link	Firma	Zweck
Benchling	https://www.benchling.com	Benchling, San Francisco, USA	Analyse der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen, Erstellung von Genkarten, Design von CRISPR sgRNAs, Planung von Klonierungen und PCRs, Design von Primern
Biorender	https://biorender.com	BioRender, Toronto, CAN	Erstellung von wissenschaftlichen Abbildungen
FlowJo	Version 10.10.0	BD Rhapsody, Ashland, USA	Analyse von Durchflusszytometrischen Daten
FluoStar Omega	Version 5.70	R2 BMG Labtech	Analyse der ELISA Daten
Fruityfly.org	https://www.fruityfly.org/seq_tools/splice.html	BDGP	Werkzeug zur Vorhersage von Spleißstellen
GraphPad (Prism 9)	Version: 9.3.1.	GraphPad Software, San Diego, USA	Erstellung von wissenschaftlichen

GV-SOLAS Empfehlungen	https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2017/03/Fachinformation-Injektionsvolumina_2022.pdf	-	Abbildungen und Zusammenfassung der Daten Berechnung des Injektionsvolumens für den adoptiven Transfer
Microsoft Office	Version 16.70	Microsoft, Redmond, USA	Excel, PowerPoint, Word, Teams
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov	NCBI, USA	Genomdatenbank und Erstellung von Genom-Alignments
PyRat	https://btr-tum.pyrat.cloud/cgi-bin/login.py	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden, GER	Datenbank für das Management der Tierhaltung
SPSS Statistics	Version: 28.0.1.1 (14)	IBM, USA	Statistische Analysen
Viewpoint	Version 1.0.0.9628	Precipoint, Garching bei München, GER	Scan und Messung von histologischen Schnitten
Workbench	https://workbench.uib.tum.de	Technische Universität München, München, GER	Online-Laborbuch zur Dokumentation der Experimente und der generierten Daten

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 gDNA-Gewinnung

Genomische DNA (gDNA) wurde je nach Ausgangsmaterial auf verschiedene Weisen gewonnen. Es wurde aus PGCs (siehe Methode 5.1.1.1), Blut (siehe Methode 5.1.1.2), Muskelgewebe (siehe Methode 5.1.1.3) und Sperma (siehe Methode 5.1.1.4) isoliert.

5.1.1.1 gDNA-Isolierung aus PGCs

Für die Isolierung von gDNA aus PGCs wurde das ReliaPrep™ Blood gDNA MiniPrep Systems Kit (siehe Tabelle 43) genutzt. Mindestens 300.000 Zellen wurden zunächst durch Zentrifugierung bei 300g für 5 Minuten pelletiert und in Cell Lysis Buffer (CLD) mit 20µL Proteinase K durch Vortexen resuspendiert. Der Mix wurde für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach wurde 250µL Binding-Buffer hinzugefügt und die Lösung erneut sorgfältig gevortext. Die gesamte Mischung wurde dann auf eine ReliaPrep™ Bindungssäule überführt und für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 500µL Column Wash Solution wurden hinzugefügt und die Säule bei maximaler Geschwindigkeit für 3 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt. Daraufhin wurde die Säule auf ein 1,5mL Eppendorf Röhrchen gesteckt und 50µL Nuklease-freies Wasser hinzugefügt und nochmals 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die dadurch gewonnene gDNA wurde dann auf -20°C gelagert.

5.1.1.2 gDNA-Isolierung aus Blut

Bei der Gewinnung von gDNA aus Blut wurde das „quick and dirty“ Protokoll verwendet, für welches 1µL zuvor gevortextes Blut mit 200µL STM-Puffer in einen Megablock oder einem 1,5mL Eppendorf-Röhrchen gegeben wurde. Der Mix wurde sorgfältig gevortext und dann für 5 Minuten bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400µL TEN-Puffer mit 100µg/mL Pronase E resuspendiert und für 1h bei 37°C unter Schütteln (250rpm) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Pronase E bei 65°C für 20 Minuten inaktiviert. Die gewonnene gDNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.1.3 gDNA-Isolierung aus Gewebe

gDNA aus Gewebe wurde ebenfalls mittels „quick and dirty“ Protokoll isoliert. Zunächst wurde das erbsengroße Stück des Gewebes in 250µL Tissue Lysis Puffer gelegt und 20mg/mL Proteinkinase K in einen Megablock oder ein 1,5mL Eppendorf-Röhrchen hinzugefügt. Der Mix wurde sorgfältig gevortext und für 12-20 Stunden bei 56°C unter Schütteln (350rpm) inkubiert. Die Proben wurden erneut gevortext und dann für 20 Minuten bei 3.600rpm zentrifugiert. 50µL Isopropanol wurden in einer V-Boden-Platte oder einem 1,5mL Eppendorf Röhrchen vorgelegt, 50µL des Gewebeüberstandes wurden hinzugefügt und für 15 Minuten bei 3.600rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die gewonnene gDNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.1.4 gDNA-Isolierung aus Sperma

Um aus Sperma gDNA zu gewinnen, wurde das „quick and dirty“ Protokoll verwendet. 5µL des Spermas wurden in 200µL TEN-Puffer mit 100µg/mL Pronase E gelöst und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (500rpm) inkubiert. Die Pronase E wurde daraufhin bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Die gewonnene gDNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.2 Isolierung von RNA

Ribonukleinsäure (RNA) wurde entweder aus einem PBMC-Zellpellet (siehe Methode 5.1.2.1), welches durch Dichtezentrifugierung (siehe Methode 5.1.6.1) aus Blut gewonnen wurde, oder aus den lymphatischen Organen Bursa, Milz und Thymus (siehe Methode 5.1.2.2) isoliert.

5.1.2.1 Isolierung von RNA aus PBMCs

Für die Isolierung von RNA aus PBMCs wurde das ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep System Kit (siehe Tabelle 43) genutzt. Im ersten Schritt wurde die pelletierten Zellen in eiskaltem PBS gewaschen und bei 3.000g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500µL 1-Thioglycerol mit BL-Puffer (Mischungsverhältnis 1:100) resuspendiert. Die Probe wurde mehrfach auf- und abpipettiert, um die Zellen zu lysieren. Als nächstes wurden 170µL Isopropanol hinzugefügt, die Mischung sorgfältig

gevortext und dann auf eine Minisäule gegeben. Es folgte eine Zentrifugierung bei 14.000g für 30 Sekunden. Der Durchfluss wurde verworfen. Mit 500µL RNA Wash Solution wurde die Säule gewaschen, erneut bei 14.000g für 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Für den DNase-I Verdau-Mix wurden 24µL Yellow Core Buffer, 3µL MnCl₂ und 3µL DNase-I gemischt. Der Mix wurde auf die Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200µL RNA Wash Solution wurden hinzugefügt und für 30 Sekunden bei 14.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Es wurde nochmals mit 300µL RNA Wash Solution gewaschen und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5mL Eppendorf-Röhrchen gesteckt und 50µL Nuklease-freies Wasser hinzugefügt. Nach 1 Minute Zentrifugation bei 12.000 g wurden 3µL der RNA direkt verwendet, um die Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA mittels Bioanalyzer (siehe Methode 5.1.3) zu analysieren. Die restliche RNA wurde auf -80°C eingefroren.

5.1.2.2 Isolierung von RNA aus Gewebe (Bursa, Thymus, Milz)

Zur Isolierung von RNA aus Bursa, Thymus und Milz wurde das ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System Kit (siehe Tabelle 43) verwendet. Bis zur RNA-Isolierung wurde die Organe in RNA-later bei -20°C gelagert. Jedes Organ wurde aus dem RNA-later entnommen und zunächst mit 500µl PBS ab gespült. Dann wurde, je nach Größe des Organs, ein Drittel bis die Hälfte des Organs mit einer sterilisierten Schere und Pinzette abgeschnitten. Der abgeschnittene Teil des Organs wurde anschließend in ein InnuSpeed Lysis Tube auf Eis übertragen. Zu jeder Probe wurden 500µl LBA plus 1-Thioglycerol im Verhältnis 50:1 zugegeben. Die Proben wurden im SpeedMill-Homogenisator sechsmal sechs Minuten lang homogenisiert. 170µL Isopropanol wurden hinzugefügt und der Mix sorgfältig gevortext. Das Lysat wurde auf eine Minisäule pipettiert und bei 14.000g für 30 Sekunden gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen, 500µL RNA Wash Solution wurden hinzugefügt und erneut bei 14.000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Daraufhin wurde die Probe für 3 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert und in ein 1,5mL Eppendorf-Röhrchen überführt. Für den DNase-I Verdau-Mix wurden 24µL Yellow Core Buffer, 3µL MnCl₂ und 3µL DNase-I gemischt, auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200µL RNA Wash Solution wurden hinzugefügt und der Mix für 30 Sekunden bei 14.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurde

erneut gewaschen mit 300µL RNA Wash Solution und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA wurde eluiert mit 30µL Nuklease-freiem Wasser. 3µL der RNA wurde direkt verwendet, um die Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA mittels Bioanalyzer (siehe Methode 5.1.3) zu analysieren.

5.1.3 Messung der Reinheit und Integrität der RNA mittels Bioanalyzer

Bioanalyzer-Messungen wurden durchgeführt, um die Konzentration und Integrität der zuvor isolierten RNA (siehe Methode 5.1.2) zu bestimmen mithilfe des Agilent RNA 6.000 Nano Kits (siehe Tabelle 43). 3µL der isolierten RNA wurden aliquotiert und durch eine zweiminütige Inkubation bei 70°C in einem Thermocycler denaturiert. Die RNA wurde während der anschließenden Vorbereitung des RNA-Chips auf Eis gelegt. Die Reagenzien wurden 30 Minuten vorher auf Raumtemperatur gestellt. RNA 6.000 Nano Dye-Konzentrat wurde für 60 Sekunden zentrifugiert. 1µL des RNA 6.000 Dye-Konzentrates wurde auf ein 65µL Aliquot der Gelmatrix gegeben. Der Mix wurde sorgfältig gevortext und für 10 Minuten bei 13.000g zentrifugiert. Der Gel-Dye Mix wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Der RNA Nano Chip wurde in die Priming Station gelegt und 9µL von dem Mix in das mit G markierte Well gegeben. Der Kolben der Spritze wurde runter gedrückt und für 30 Sekunden gehalten, sodass die Gelmatrix im Chip verteilt wurde. Je 9µL des Gel-Dye Mixes wurden in die zwei weiteren Kontroll-Wells pipettiert. Je 5µL RNA 6.000 Nanomarker wurden in jedes Proben-Well und in das Ladder-Well pipettiert. 1µL RNA-Ladder wurde in das Ladder-Well hinzugefügt. Dann wurden 1µL der Probe in je ein Proben-Well hinzugefügt. Der Chip wurde horizontal in den IKA Vortex Mixer gegeben und für 1 Minute bei 2400rpm gevortext. Der Chip wurde in den Agilent 2.100 Bioanalyzer gelegt und gemessen. Die gemessene Konzentration wurde später zur Bestimmung des Probenvolumens verwendet die für die cDNA-Synthese verwendet werden muss. Für die weitere cDNA-Synthese (siehe Methode 5.1.4) wurden nur RNA mit einer RNA-Integritätszahl (RIN) von 7,5 oder höher verwendet.

5.1.4 cDNA-Synthese

Das Kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (siehe Tabelle 43) wurde für die Transkription der RNA in cDNA verwendet. Hierfür wurde ein Reaktionsansatz mit folgenden Komponenten gemischt:

Tabelle 51: Mastermixes der cDNA-Synthese

Bestandteile	Volumen
GoScript™ Reaction Buffer, Random Primers	4µL
GoScript™ Enzyme Mix	2µL
RNA	400ng
Nuklease-freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL

Der Ansatz wurde daraufhin mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tabelle 52: Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Annealing	25°C	5 Minuten	1x
Extension	42°C	60 Minuten	1x
Inaktivierung	70°C	15 Minuten	1x

Die cDNA wurde auf -20°C gelagert.

5.1.5 Polymerasekettenreaktionen

Polymerasekettenreaktionen (PCRs) wurden für die Bestimmung des Geschlechtes (siehe Methode 5.1.5.1), der Genotypen (siehe Methode 5.1.5.2, 5.1.5.3, 5.1.5.5, 5.1.5.6) und der MHC-Haplotypen (siehe Methode 5.1.5.4) eingesetzt.

5.1.5.1 Geschlechtsbestimmung

Für die Geschlechtsbestimmung der Hühner wurde die HOT Firepol DNA Polymerase Mastermix (siehe Tabelle 36) eingesetzt. Primer #1 und #2 (siehe Tabelle 44) sind zur Bestimmung des Z-Chromosoms und erzeugen eine Amplikonlänge von 250bp. Die Primer #3 und #4 (siehe Tabelle 44) werden zur Bestimmung des W-Chromosoms eingesetzt und erzeugen ein Amplikon von 375bp.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 53: Mastermixes für die Geschlechtsbestimmungs-PCR

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5X HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4µL	1x
Forward Primer #1 und #3	Je 1µL	0,25µM
Reverse Primer #2 und #4	Je 1µL	0,25µM
DNA	Je 2µL	Variable
Nuklease-freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

Der Ansatz wurde daraufhin mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tabelle 54: Temperaturprogramm für die Geschlechtsbestimmungs-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	12 Minuten	1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	35x
Annealing	56°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Lagerung	12°C	Unbegrenzt	-

5.1.5.2 Genotyping TCR Cβ KO-Hühner

Für das Genotyping der TCR Cβ KO-Hühner wurde die HOT Firepol DNA Polymerase Mastermix (siehe Tabelle 36) eingesetzt. Primer #426 und #223 (siehe Tabelle 44) sind zur Bestimmung der Loop-out Region und erzeugen eine Amplikonlänge von 679bp. Die Primer #426 und #1172 (siehe Tabelle 44) werden zur Bestimmung der Wildtyp TCR Cβ-Region eingesetzt und erzeugt ein Amplikon von 313bp.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 55: Mastermixes für das TCR C β KO-Genotyping

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5X HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4 μ L	1x
Forward Primer #426	Je 1 μ L	0,25 μ M
Reverse Primer #223 und #1172	Je 1 μ L	0,25 μ M
DNA	Je 2 μ L	Variable
Nuklease-freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L	

Der Ansatz wurde daraufhin mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tabelle 56: Temperaturprogramm für das TCR C β KO-Genotyping

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	12 Minuten	1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	40x
Annealing	58°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Lagerung	12°C	Unbegrenzt	-

5.1.5.3 Genotyping TCR C γ KO-Hühner

Für die Genotypisierung der TCR C γ KO-Hühner wurde die HOT Firepol DNA Polymerase Mastermix (Tabelle 36) eingesetzt. Primer #121 und #223 (siehe Tabelle 44) sind zur Bestimmung der Loop-out Region und erzeugt ein Amplikon von 676bp. Die Primer #59 und #35 (siehe Tabelle 44) werden zur Bestimmung der Wildtyp TCR C γ -Region eingesetzt und erzeugen eine Amplikonlänge von 384bp.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 57: Mastermix für das TCR C γ KO-Genotyping

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5X HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4 μ L	1x
Forward Primer #121 und #59	Je 1 μ L	0,25 μ M
Reverse Primer #223 und #35	Je 1 μ L	0,25 μ M
DNA	Je 2 μ L	Variable
Nuklease-freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L	

Der Ansatz wurde daraufhin mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tabelle 58: Temperaturprogramm für das TCR C γ KO-Genotyping

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	12 Minuten	1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	40x
Annealing	60°C	40 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Lagerung	12°C	Unbegrenzt	-

5.1.5.4 MHC-Haplotypisierung

Für die MHC-Haplotypisierung der Hühner wurde die FIREpol® DNA Polymerase Mastermix (siehe Tabelle 36) eingesetzt. Primer wurden je nach Haplotyp gemäß 4.11.1 (siehe Tabelle 44) eingesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 59: Mastermix für das MHC-Haplotyping

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5X HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4µL	1x
Forward Primer	Je 4µL	0,25µM
Reverse Primer	Je 4µL	0,25µM
DNA	Je 2µL	Variable
Nuklease freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

Das für die MHC-Haplotypsierung verwendete Programm ist in der folgenden Tabelle dargestellt, mit Ausnahme von Änderungen der Annealing-Temperatur entsprechend dem Optimum der Primer (siehe Tabelle 44).

Tabelle 60: Temperaturprogramm für das MHC-Haplotyping

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 Minuten	1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	30x
Annealing	60-63°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	60 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Lagerung	12°C	Unbegrenzt	-

5.1.5.5 Cre-Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Cre ER^{T2}-Klone wurde die HOT Firepol DNA Polymerase Mastermix (siehe Tabelle 36) eingesetzt. Primer #196 und #197 (siehe Tabelle 44) sind zur Bestimmung der Cre-Region und erzeugen eine Amplikonlänge von 676bp.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Table 61: Mastermix für das Cre-Genotyping

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5X HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4µL	1x
Forward Primer #121 und #59	Je 1µL	0,25µM
Reverse Primer #223 und #35	Je 1µL	0,25µM
DNA	Je 2µL	Variable
Nuklease freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

Der Ansatz wurde daraufhin mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Table 62: Temperaturprogramm für das Cre-Genotyping

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	12 Minuten	1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	35x
Annealing	63°C	60 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Lagerung	12°C	Unbegrenzt	-

5.1.5.6 loxP TCR Cβ^{KI}-Genotypisierung

Für die Genotypisierung der loxP TCR Cβ^{KI}-Klone wurde die HOT Firepol DNA-Polymerase Mastermix (siehe Tabelle 36) eingesetzt. Primer #548 und #1690 (siehe Tabelle 44) sind zur Bestimmung der loxP-Region und erzeugt ein Amplikon von 1154bp.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Table 63: Mastermix für das loxP TCR C β ^{KI}-Genotyping

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5X HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4 μ L	1x
Forward Primer #548	Je 4 μ L	0,25 μ M
Reverse Primer #1690	Je 4 μ L	0,25 μ M
DNA	Je 2 μ L	Variable
Nuklease freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L	

Der Ansatz wurde daraufhin mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Table 64: Temperaturprogramm für das loxP TCR C β ^{KI}-Genotyping

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten	1x
Denaturierung	95°C	40 Sekunden	40x
Annealing	63°C	60 Sekunden	
Elongation	72°C	60 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Lagerung	12°C	Unbegrenzt	-

5.1.5.7 Gelelektrophorese

Die entstandenen PCR- bzw. Verdau-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese entsprechend der Größe aufgetrennt. Je nach Anzahl der Proben wurde die Menge des Gels bestimmt. In der Regel wurde ein 1%iges TBE-Gel hergestellt. Wenn das DNA-Fragment allerdings sehr klein war, wurde ein 1,5-2% Gel hergestellt. Bei sehr großen Fragmenten wurde ein 0,8%iges Gel hergestellt. Hierfür wurde zunächst die Agarose in TBE eingewogen und in der Mikrowelle so weit erhitzt, dass sie sich löste. Danach wurde das Gel unter Rühren im Wasserbad handwarm abgekühlt. Um DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der DNA-interkalierende Farbstoff PeqGREEN hinzugefügt. Das Gel wurde in den Gelschlitten ausgegossen und bis zum Festwerden abgekühlt.

Das Agarose-Gel wurde wie folgt zusammemischt:

Tabelle 65: Zusammensetzung der Agarose-Gele

Bestandteile	Kleines Volumen	Mittleres Volumen	Großes Volumen
TBE	50mL	100mL	300mL
PeqGREEN (0,04 µL/ml)	2µL	4µL	12µL
Agarose (1%)	0,5g	1g	3g

Die DNA wird daraufhin 1:6 mit Orange G gemischt und es wurden 10µL der Probe auf das Gel geladen, sowie in eine Tasche 10µL 1kp plus Ladder. Das Gel lief je nach Größe bei einer Spannung von 90V, 100V oder 120V für circa 30 bis 90 Minuten. Detektiert wurde das Gel mittels UV-Licht.

5.1.5.8 ddPCR

Die digitale Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in einzelnen Tröpfchen und wurde zur Berechnung der Kopienzahl der Integration von Cre mittels der ebenfalls integrierten Hygromycin-Resistenz-Kassette verwendet. Ein Referenzgen (beta-actin) wird für diesen Zweck benötigt. Die Template-DNA wurde 1 Stunde lang bei 37 °C mit Xbal verdaut, dafür wurde folgender Reaktionsansatz gemischt:

Tabelle 66: Verdau der DNA für die ddPCR

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
Xbal Enzym (20U/µL)	1µL	0,4 U/µL
CutSmart® Puffer (10X)	5µL	1x
DNA	500ng	
Nuklease-freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 50µL	

5µL DNA wurden daraufhin mit 5µL H₂O verdünnt (1:2). HEX- und FAM-Primer-Mischungen (siehe Tabelle 45) wurden wie folgt vorbereitet:

Tabelle 67: HEX- und FAM-Primer-Mischungen

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
Probe #500 bzw. #650	1µL	5µM
Forward Primer #491 bzw. #648	3,6µL	18µM
Reverse Primer #492 bzw. #649	3,6µL	18µM
Nuklease-freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

Der ddPCR Reaktionsmix wurde wie folgt vorbereitet:

Tabelle 68: Mastermix ddPCR

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
2X ddPCR Supermix für Probes	12,5µL	1x
20X FAM Mix	1,25µL	0,25µM Probe; 900nM Primer
20X HEX Mix	1,25µL	0,25µM Probe; 900nM Primer
DNA	Je 2µL	Variable
Nuklease freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 25µL	

Die Tröpfchen wurden mit einem QX200TM Digital Droplet Generator erzeugt. 2 µl der Reaktionsmischung beziehungsweise der Vorlage (mittlere Reihe) und 70 µl des Tröpfchenöls (untere Reihe) wurden auf die Kartusche gegeben, mit der roten Dichtung abgedeckt und in den Tröpfchengenerator eingesetzt. 40µl der erzeugten Emulsion wurden in eine 96-Well-Platte gegeben und mit Aluminiumfolie verschlossen.

Die Platte wurde in einen PCR-Thermocycler eingesetzt und wie folgt inkubiert:

Tabelle 69: Temperaturprogramm ddPCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Ramp Rate	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten	2°C/Sekunde	1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden		40x
Annealing	59°C	60 Sekunden		1x
Signal Stabilisierung	4°C	5 Minuten		1x
	98°C	5 Minuten		-
Lagerung	12°C	Unbegrenzt		

Die Platte wurde über Nacht im Thermocycler belassen und am nächsten Tag mittels QX200 Digital Droplet Reader ausgelesen.

5.1.5.9 qRT-PCR

Quantitative (q)PCRs wurde durchgeführt, um die Expression verschiedener Zytokine zu bestimmen. Alle qRT-PCRs wurden mit dem GoTaq qPCR Master Mix Kit (siehe Tabelle 43) durchgeführt. Als House-Keeping-Gen wurde 18S (siehe Tabelle 46) eingesetzt. Alle Proben wurden in Duplikaten pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 70: Mastermix qPCR

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
GoTaq Master Mix	10µL	1x
Forward Primer	1,2µL	300ng/µL
Reverse Primer	1,2µL	300ng/µL
cDNA	0,8µL	2,5ng/µL
Nuklease freies Wasser	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

Die Platte wurde mit folgendem Programm im QuantStudio® 5 Real-time qPCR Thermocycler inkubiert:

Tabelle 71: Temperaturprogramm qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 Minuten	1x
Denaturierung	94°C	15 Sekunden	40x
Annealing	59°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
	95°C	20 Sekunden	
Dissoziationskurve	57°C	30 Sekunden	1x
	95°C	15 Sekunden	

Die statistische Analyse wurde mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode durchgeführt. Die QuantStudio™ Design & Analysis Software berechnet die Standardabweichung und den Mittelwert der Duplikate. Zur Ermittlung des ΔCt -Wert wurde der mittlere Ct-Wert des House-Keeping-Gens vom mittleren Ct-Wert des zu analysierenden Zytokins subtrahiert:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zytokin}} - Ct_{\text{House-Keeper}}$$

Der Kalibrator wurde durch Berechnung des mittleren ΔCt der WT-Proben berechnet. Im nächsten Schritt wurde das $\Delta\Delta Ct$ durch Subtraktion des Kalibrators von den einzelnen ΔCt -Werten berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{Kalibrator}$$

Der mittlere $\Delta\Delta Ct$ -Wert wurde für jeden Genotyp berechnet. Der Fold Change (fc) wurde wie folgt berechnet:

$$fc = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Standardabweichung (sd) wie folgt berechnet:

$$sd(fc) = 2^{-sd(\Delta\Delta Ct)}$$

5.1.6 Zellsortierung

Für die Immunophänotypisierung, die Messung der T-Zell Aktivierungsmarkern, die Perforin-und Granzym B-Bestimmung und den adoptiven Transfer wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Die Zellen wurden zunächst mittels Dichtezentrifugierung

isoliert (siehe Methode 5.1.6.1), dann gefärbt wurden (siehe Methoden 5.1.6.2,5.1.6.3) und dann mithilfe von FlowJo zur Auswertung gated (siehe Methode 5.1.6.5). Zur Isolierung von T-Zellen für den adoptiven Transfer aus den mCherry⁺ Spendertieren wurde eine magnetische Zellsortierung (MACS) angewandt (siehe Methode 5.1.6.4).

5.1.6.1 Dichtezentrifugierung

Zur Isolierung von PBMCs aus dem Hühnerblut wurde Histopaque 1077 als Trennmittel verwendet. Hierfür wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit Raumtemperatur warmes PBS gemischt. Das Blut-PBS-Gemisch wurde vorsichtig oben auf die gleiche Menge Histopaque in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die Probe wurde dann zwölf Minuten lang bei Raumtemperatur und 650g ohne Bremsen und Beschleunigung zentrifugiert. Die weiße PBMCs-Phase, die sich unterhalb des Plasmas und oberhalb der Roten Blutzellen und des Histopaques befindet, wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein neues Röhrchen mit 5ml eiskaltem PBS überführt. Die Zellen wurden mittels Neubauer Zählkammer gezählt (siehe Methode 5.2.1) und für die Durchflusszytometrische Färbung (siehe Methoden 5.1.6.2, 5.1.6.3) wurden 1 Million Zellen pro Well ausgesät.

5.1.6.2 Oberflächenmarker Färbung

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen gezählt und auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Eine Gesamtzellzahl von 1×10^6 Zellen (=200 μ l) wurde zur weiteren Behandlung in jede Vertiefung einer 96-Well-U-Bodenplatte übertragen. Die Platte wurde 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. 50 μ l des Lebend/Tot Farbstoffes (siehe Tabelle 37) wurden in jede Vertiefung gegeben und 20 Minuten lang auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 150 μ l Fluobuffer gewaschen und die Platte 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden dann in 50 μ l primärer Antikörperlösung (siehe Tabelle 37) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden erneut 150 μ l Fluobuffer in jede Vertiefung gegeben, und die Platte wurde 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden dann in 50 μ l Sekundärantikörperlösung (siehe Tabelle 38) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden 150 μ l Fluobuffer dazu gegeben und die Platte 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 200µl Fluobuffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert (Attune NxT FlowCytometer). Die Datenanalyse wurde mit der Software FlowJo (siehe Tabelle 50) durchgeführt.

5.1.6.3 zytosolische Färbung

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen gezählt und auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml gebracht werden. Eine Gesamtzellzahl von 1×10^6 Zellen (=200µl) wurde in eine 96-Well-U-Bodenplatte pipettiert. Die Platte wurde 1 Minute bei 700g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 50µl des primären Antikörpers (siehe Tabelle 37) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 150µl Fluobuffer gewaschen, 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Dann wurden die Zellen mit 50µl des sekundärem Antikörper resuspendiert und 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert, mit 150µl Fluobuffer gewaschen, 1 Minute lang bei 700 g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 200µl Fixierlösung (1:10 verdünnt) resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Erneut wurden die Zellen 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100µl Permeabilisierungslösung resuspendiert und 10 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 200µl Fluobuffer gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50µL des Granzyme B-und Perforin-Antikörpers (siehe Tabelle 37) resuspendiert und 20 Minuten lang auf Eis im Dunkeln inkubiert. 150µl Fluobuffer wurden hinzugefügt und weitere 5 Minuten bei RT inkubiert und 1 Minute lang bei 700g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen nochmals mit 200µl Fluobuffer, welches für 5 Minuten inkubiert wurde, gewaschen und daraufhin zentrifugiert bei 700g für 1 Minute. Die Zellen wurden für die FACS-Messung in 200µl Fluobuffer resuspendiert.

5.1.6.4 MACS

MACS wurde verwendet, um entweder $\alpha\beta$ T-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen für den adoptiven Transfer aus mCherry⁺-Spenderhühnern zu sortieren. Die isolierten Lymphozyten wurden 10 Minuten lang bei 300g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Pellet in 500µl Antikörperlösung resuspendiert. Die Proben werden 20 Minuten lang auf Eis im Dunkeln gelagert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit bis zu 1ml Labellingbuffer aufgefüllt und 7 Minuten lang bei 350g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180µL Labeling Buffer und 20µL anti-FITC MicroBeads (siehe Tabelle 39) resuspendiert. Die Proben wurden 15 Minuten lang bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bis zu 1ml mit Labellingbuffer aufgefüllt und 7 Minuten bei 350g bei 4°C zentrifugiert. Der Magnet und die Säulen wurden aufgestellt und die Säulen mit 3ml Separation Buffer vorbereitet. Das Pellet wurde dann in 750µl Separationspuffer resuspendiert und auf die Säule gegeben. Der negative Fluss der Proben wurde in einem 15mL-Falcon-Röhrchen aufgefangen und bei leerer Säule dreimal mit 4mL Separation Buffer gespült. Nach dem Spülen wurde der positive Durchfluss aufgefangen, indem die Säule vom Magneten entfernt und auf ein neues 15mL Falcon-Röhrchen gesetzt wurde. Nun wurden 5mL Separationspuffer auf die Säule gegeben und sofort mit Hilfe des Kolbens durch die Säule gedrückt, um den positiven Durchfluss zu gewinnen. Sowohl der negative als auch der positive Durchfluss wurden 7 Minuten lang bei 350g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in der zulässigen i.v. Applikationsmenge (1mL/1kg) PBS + 1% BSA gemäß GV-SOLAS Empfehlung resuspendiert, um sie in die Empfängerhühner zu injizieren (siehe Methode 5.3.6). Um die Reinheit der isolierten Zellen zu bewerten, wurde eine Durchflusszytometrie-Analyse des positiven und negativen Durchflusses durchgeführt.

5.1.6.5 Gating-Strategien

Für die Immunophänotypisierung wurde auf CD3⁺ T-Zellen, αβ T-Zellen, γδ T-Zellen inklusive CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen, B-Zellen und Monozyten wie folgt gated:

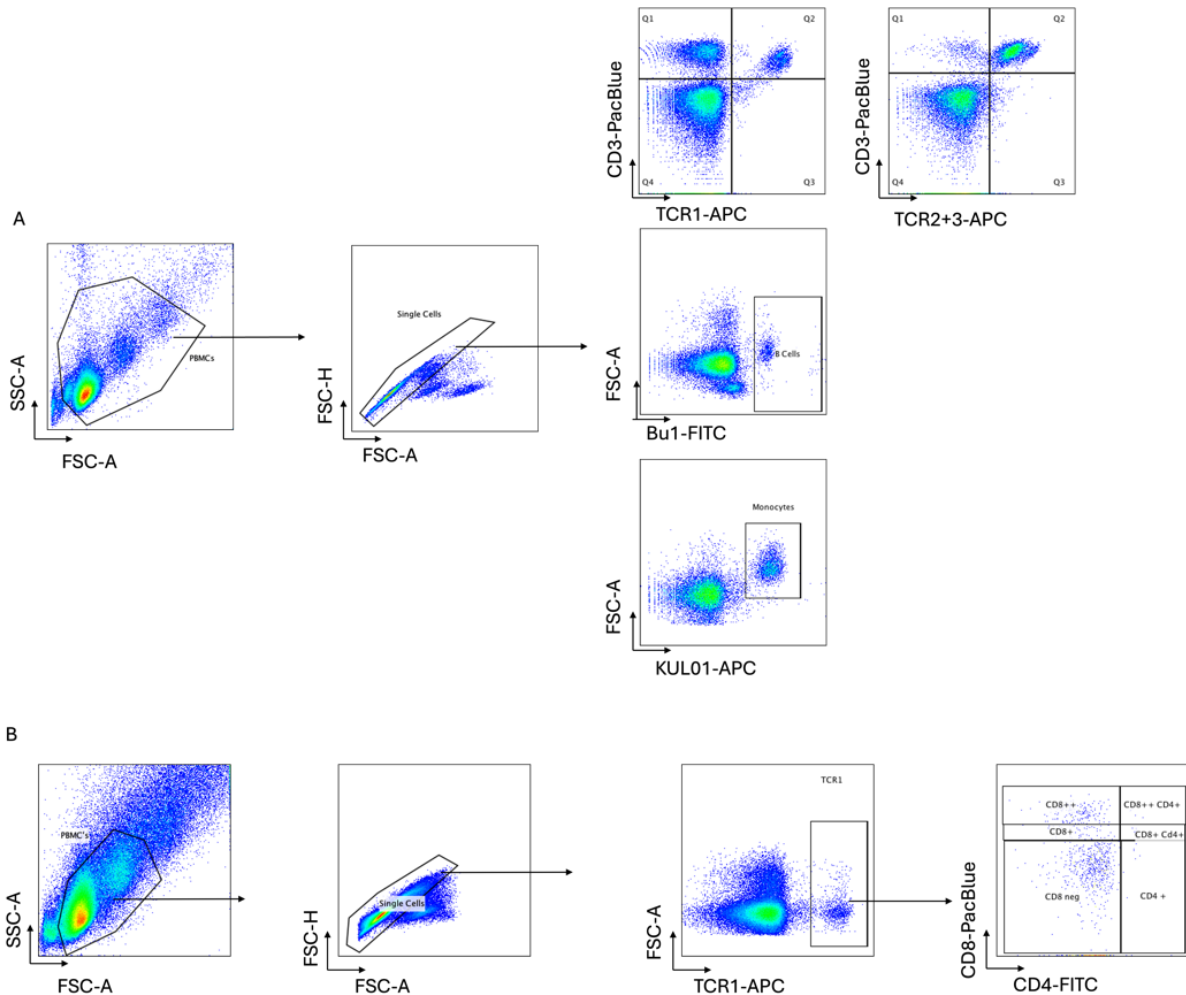


Abbildung 13: Gating-Strategie für die Immunophänotypisierung. Repräsentativer Dotplot eines Wildtyp-Tieres im Alter von zwei Wochen zur Verdeutlichung der Gating-Strategie. Zunächst wurden FSC-A gegen SSC-A geplottet, um die PBMC-Population zu identifizieren. Danach wurde FSC-A gegen FSC-H geplottet, um Doubletten zu exkludieren. Dann wurden die entsprechenden Färbungen analysiert. A) Bestimmung der CD3⁺T-Zellen (CT-3-PacBlue), αβ- und γδ-T-Zellen (TCR1/2+3-APC), B-Zellen (Bu-1-FITC) und Monozyten (KUL01-APC). B) Gating der CD4⁺ (CT-4-FITC) und CD8⁺ (CT-8-PacBlue) Subpopulationen.

Um die T-Zell Aktivierungsmarker CD25, MHC II, CD28 und CD57 zu bestimmen, wurde folgende Gating Strategie verwendet:

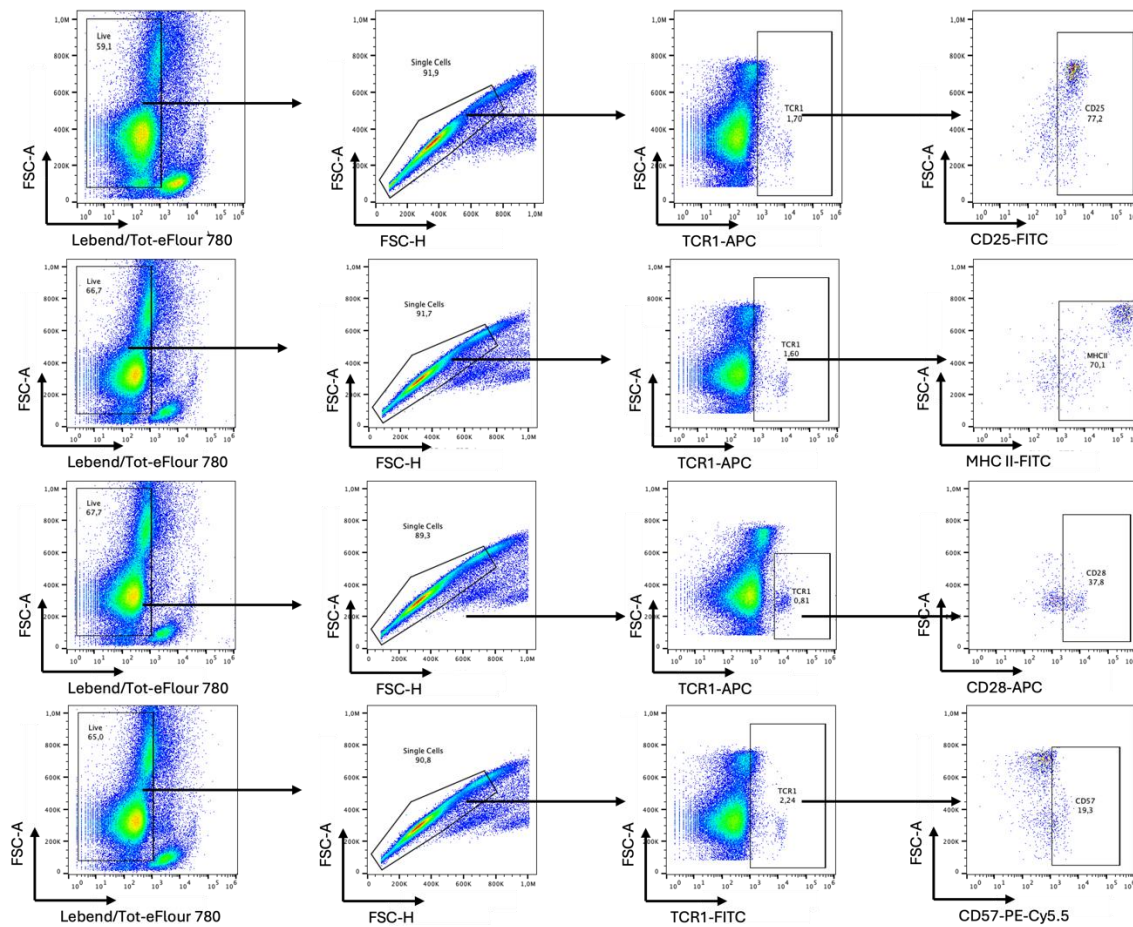


Abbildung 14: Gating-Strategie zur Bestimmung der T-Zell Aktivierungsmarker CD25(AbD13504-FITC), MHC II (2G11-FITC), CD28(AV7-APC) und CD57(NK-1-PE-Cy5.5). Repräsentativer Dotplot eines Wildtyp-Tieres im Alter von zwei Wochen zur Verdeutlichung der Gating-Strategie. Zunächst wurden FSC-A gegen eFlour780 geplottet, um lebende Zellen zu identifizieren. Danach wurde FSC-A gegen FSC-H geplottet, um Doubletten zu exkludieren. Dann wurden die $\gamma\delta$ -T-Zellen (TCR1-FITC) gated und danach die T-Zellaktivierungsmarker analysiert. Adaptiert von Heyl et al. [91].

Die Bestimmung der Perforin- und Granzym B-Werte innerhalb der CD3⁺ T-Zellen wurde wie folgt gated:

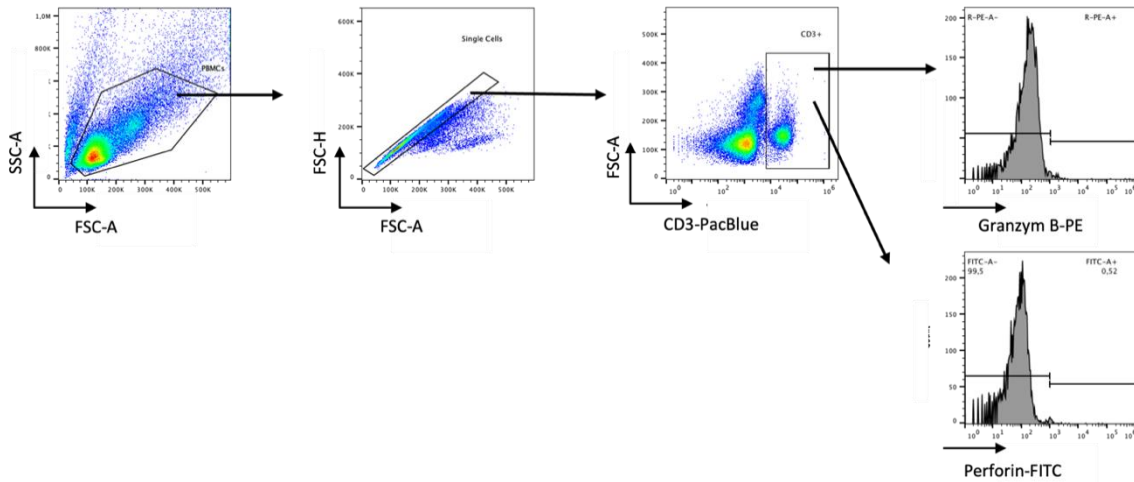


Abbildung 15: Gating-Strategie für die Perforin-FITC und Granzym B-PE Färbung. Repräsentativer Dotplot eines Wildtyp-Tieres im Alter von zwei Wochen zur Verdeutlichung der Gating-Strategie. Zunächst wurden FSC-A gegen SSC-A geplottet, um die PBMC-Population zu identifizieren. Danach wurde FSC-A gegen FSC-H geplottet, um Doubletten zu exkludieren. Dann wurden die CD3⁺ T-Zellen (CT-3-PacBlue) gated und danach Perforin beziehungsweise Granzym B analysiert.

Für die Bestimmung der mCherry⁺-Zellen nach dem MACS und nach dem adoptiven Transfer wurden folgende Gating Strategien angewandt:

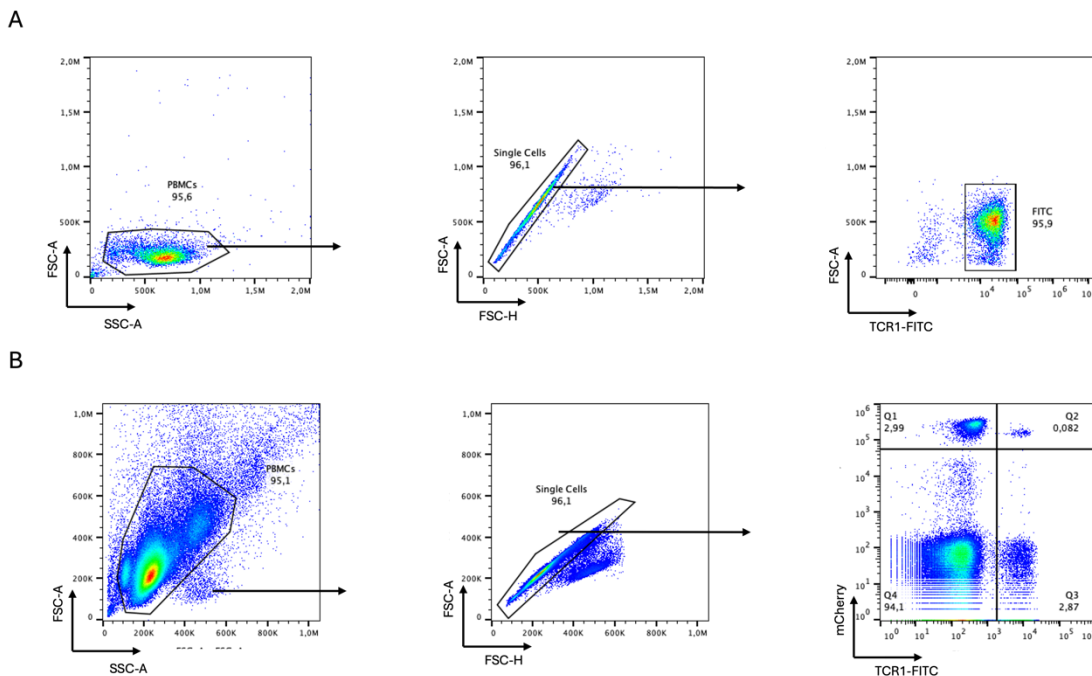


Abbildung 16: Gating-Strategie für A) die Reinheit der mCherry⁺-Zellen nach MACS und B) Bestimmung der mCherry⁺ Zellen nach adoptiven Transfer in TCR KO-Tieren. Repräsentativer Dotplot eines Wildtyp-Tieres im Alter von zwei Wochen zur Verdeutlichung der Gating-Strategie. Zunächst wurden FSC-A gegen SSC-A geplottet, um die PBMC-Population zu identifizieren. Danach wurde FSC-A gegen FSC-H geplottet, um Doubletten zu exkludieren. Dann wurden die T-Zell Subpopulation (TCR1/2+3-FITC) und mCherry⁺-Zellen analysiert.

5.1.7 Histologie

Das Gewebe wurde entweder bei -80 °C in O.C.T. Tissue Tek Compound (Thermo Fisher Scientific) eingefroren oder in Paraffin eingebettet. Für das Einfrieren wurde zunächst in O.C.T. Tissue Tek Compound in eine Einbettform vorgelegt, dann das Organ hineingelegt und mit Tissue Tek vollständig bedeckt. Die Einbettform in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann in den -80°C Kühltank überführt. Für die Einbettung in Paraffin, wurde das Organ über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert, dann in 40% Ethanol überführt. Die Ethanol Konzentration wurde langsam auf 70% erhöht und dann über Nacht im Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica Biosystems) dehydrogenisiert und paraffinisiert. Am nächsten Tag wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Vor dem Schneiden wurde das gefrorene Gewebe über Nacht bei -20 °C gelagert. Es wurden etwa 7-8 µm große Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet.

5.1.7.1 H&E-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) können entweder Paraffinproben oder O.C.T-Proben verwendet werden. Paraffinschnitte wurden zunächst durch eine absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert.

Tabelle 72: absteigende Alkoholreihe für das Entparaffinisieren von Paraffin-Schnitten

Schritt	Zeit
Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten
Isopropanol I	Kurz schwenken
Isopropanol II	Kurz schwenken
99%iger Ethanol	Kurz schwenken
70%iger Ethanol	Kurz schwenken
dH ₂ O	Kurz schwenken

Die O.C.T. Schnitte wurden zwei Minuten lang in eiskaltem Aceton fixiert und für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten lang in PBS rehydriert und kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Ab diesem Schritt wurden die Paraffin- und O.C.T-Schnitte gleich verarbeitet. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte mit Mayer's Hämatoxylin für 10 Minuten gefärbt. Danach wurden die Schnitte in

destilliertem Wasser geschwenkt und für 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurde mit Eosin für 1,5 Minuten gefärbt und danach für 2 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Für das Entwässern der Schnitte wurden sie zwei Minuten lang in Isopropanol II und zwei Minuten in Isopropanol I gehalten. Vectamount Express-Eindeckmedium wurde zum Eindeckeln der Schnitte verwendet. Die Objektträger wurden mit dem Precipoint-Mikroskop gescannt und analysiert.

5.1.7.2 Immunhistologie

Nachdem die Kryoschnitte über Nacht getrocknet wurden, wurden die Gewebeproben zwei Minuten lang in eiskaltem Aceton fixiert und für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die Proben wurden dann 15 Minuten in PBS rehydriert und schnell in destilliertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase durch 400µl 40% Methanol + 0,3% H₂O₂ auf jeden Objektträger blockiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Gewebeproben 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Reduzierung der unspezifischen Färbung wurde eine Blockierung mit Serum durchgeführt. Für diesen Schritt wurde Pferdeserum (Serum der Tierart, von der der sekundäre Antikörper stammt) im Verhältnis 1:40 in PBS + 1 % BSA verdünnt, die Objektträger wurden mit je 250µl vollständig bedeckt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen des Serums wurden die Objektträger mit circa 250µL des jeweiligen primären Antikörpers (siehe Tabelle 40) bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Der Primärantikörper wurden 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Pferd-Anti-Maus-IgG-Biotin aus dem Vectastain ABC Peroxidase Kit; siehe Tabelle 43) wurde 1:200 in PBS verdünnt. Anschließend wurden die Objektträger vollständig mit der Sekundärantikörperverdünnung bedeckt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach 45 Minuten wurde der Avidin-Peroxidase-Komplex aus dem Vectastain ABC-Peroxidase Kit (siehe Tabelle 43) hergestellt. Dazu wurden Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt und anschließend gut gemischt. Dieser Komplex wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Objektträger 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger vollständig mit dem inkubierten Avidin-Peroxidase-Komplex bedeckt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten

Kammer im Dunkeln inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Avidin-Peroxidase-Komplex abgewaschen (3x5 min in PBS) und die Objektträger anschließend vollständig mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)-Lösung (siehe Tabelle 43) bedeckt. Die DAB-Lösung wurde wegen der Lichtempfindlichkeit erst kurz vor der Verwendung gemischt. Die Objektträger wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DAB-Lösung mit Hilfe einer Pasteurpipette und Leitungswasser in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen abgewaschen und dann die Reaktion 5 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Danach wurden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser geschwenkt und 40 Sekunden lang mit Hämatoxylin gefärbt. Die Objektträger wurden erneut kurz in destilliertes Wasser getaucht, bevor sie 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden. Anschließend wurden die Objektträger für weitere 5 Minuten in Leitungswasser gelegt. Für die Entwässerung der Gewebeschnitte wurden die Gewebeproben für je zwei Minuten in Isopropanol II und Isopropanol I gelegt. Im letzten Schritt wurden je nach Größe und Anzahl der Schnitte ein oder mehrere Tropfen Vectamount Express-Eindeckmedium auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt. Die Objektträger wurden mit dem Precipoint-Mikroskop gescannt.

5.1.7.3 Fluoreszenzhistologie

Nachdem die Kryoschnitte über Nacht getrocknet wurden, wurden die Gewebeproben zwei Minuten lang in eiskaltem Aceton fixiert und 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die Proben wurden dann 15 Minuten lang in PBS rehydriert und schnell in destilliertem Wasser geschwenkt. Zur Reduzierung der unspezifischen Färbung wurde eine Blockierung mit Serum durchgeführt. Für diesen Schritt wurde Ziegen Serum im Verhältnis 1:40 in PBS + 1 % BSA verdünnt, die Objektträger wurden mit je 250µl vollständig bedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunklen inkubiert. Nach Abkippen des Serums wurden die Objektträger mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tabelle 41) bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Der Primärantikörper wurden 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 41) wurde 1:200 in PBS verdünnt. Anschließend wurden die Objektträger vollständig mit der Sekundärantikörperverdünnung bedeckt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde mit

Mausserum im Verhältnis 1:40 in PBS + 1 % BSA blockiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach Abklopfen des Serums wurden die Schnitte mit je 250µL Bu1-FITC Lösung + 0,01% DAPI (siehe Tabelle 41) bedeckt und für eine Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Der Antikörper wurden 3x5 Minuten in PBS abgewaschen. Im letzten Schritt wurden je nach Größe und Anzahl der Schnitte ein oder mehrere Tropfen Vectorschield Mounting Medium auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt. Die Bilder wurden mit einem ECHO Revolve Mikroskop aufgenommen.

5.1.7.4 Bestimmung der maximalen Invasionstiefe der Shizonten

Zur Ermittlung der maximale Invasionstiefe der Shizonten wurden 50 repräsentative Schnitte von WT-und TCR C γ KO-Hühnern präpariert und mit H&E gefärbt und mit dem Precipoint-Mikroskop gescannt. Die maximale Eindringtiefe jedes Schnittes wurde gemessen, indem die maximale Länge der Shizonten von der Mukosa Muskularis in die Submukosa gemessen wurde.



Abbildung 17: Bestimmung der maximalen Shizonten-Invasionstiefe. Gemessen wurden alle Stellen, an welchen die Shizonten die Lamina Propria durchbrochen haben und in die Submukosa eingewandert sind. Die maximale Invasionstiefe von jedem Schnitt wurde ausgewählt.

5.1.7.5 Scoring System für Läsionen

Zum Scoring wurden 25 repräsentative Schnitte von jedem WT- und TCR γ KO-Tier präpariert, mit H&E gefärbt und mit einem Precipoint-Mikroskop gescannt. Jedem Schnitt wurde für die Kriterien Nekrotischer Debris, Hämorrhagie, Kryptenatrophie und Mukosadisruption ein Score von 0-3 gegeben und daraus den Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Der Score wurde nach folgenden Merkmalen vergeben:


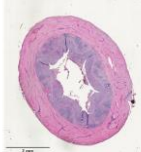
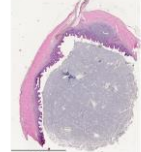
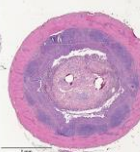
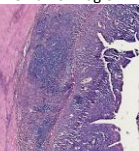
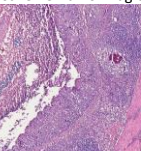
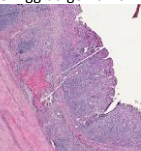
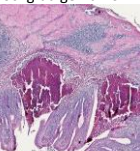








Läsion	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Nekrotischer Debris	Keine Nekrose 	Fast keine Nekrose 	Geringgradige Nekrose 	Hochgradige Nekrose 
Hämorrhagie	Keine Hämorrhagie 	Fast keine Hämorrhagie 	Geringgradige Hämorrhagie 	Hochgradige Hämorrhagie 
Kryptenatrophie	Keine Atrophie 	Geringgradige Atrophie 	Regressive Atrophie 	Hochgradige Atrophie 
Mukosadisruption	Nirgendsw 	1-2 Stellen 	2-5 Stellen 	<5 Stellen 

Abbildung 18: Scoring-System für Läsionen. Anhand der gescannten Schnitte wurde ein Scoring-System erstellt, wobei jedem Schnitt ein Score von 0-3 für die Kriterien nekrotisches Debris, Hämorrhagie, Kryptenatrophie und Mukosadisruption gegeben wurde.

5.1.8 Bestimmung der Oozytenzahl

Der Caecuminhalt wurde mit 5 ml PBS rausspült und aufgefangen. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden die Proben mit einem Stabmixer homogenisiert und fünf Minuten lang bei 900g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet gewogen. Das Zellpellet wurde in 15ml 1,5%iger Trypsinlösung in PBS resuspendiert. Die Proben wurden 1 Stunde bei 42°C inkubiert und daraufhin mit Leitungswasser auf 50ml aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 900g zentrifugiert und mit 1 oder 10 ml aufgefüllt, je nach Größe des Pellets. 1 ml der Mischung

wurde mit 14ml MgSO₄- Lösung vermischt und in eine MAC Master Oozytenzählkammer gegeben. Die Oozysten wurden unter dem Mikroskop gezählt.

5.1.9 ELISA

Die Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte am Vortag. Die Platten wurden mit 100µl/Well Primärantikörper (siehe Tabelle 42) beschichtet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die ELISA-Platten mit dem Programm "3x PBS-T" im ELISA-Waschgerät dreimal mit PBS-T-Puffer gewaschen. 110µl/Well 4%ige Magermilchlösung wurde hinzugefügt und 1 Stunde bei RT inkubiert. Die ELISA-Platten wurden erneut 3x mit PBS-T-Puffer gewaschen. 100µl einer 4%igen Magermilchlösung wurden in alle Vertiefungen gegeben. Eine Vorverdünnung von 50µl mit 1:100 für IgM und IgY und 1:10 für IgA wurde in Reihe A der Platte gegeben. Danach wurde eine serielle Verdünnung durchgeführt. Dazu wurden 50µl der Reihe A zu Reihe B gegeben. Diese log³-Verdünnungsreihe wurde bis zum Ende der Platte fortgesetzt. 50µL der letzten Vertiefung wurden verworfen, sodass in jedem Well Volumen von 100µL/Well vorhanden war. 4%ige Magermilchlösung diente als Negativkontrolle. Die Platten wurden versiegelt und 1 Stunde bei RT inkubiert. Die ELISA-Platten wieder 3x mit PBS-T-Puffer gewaschen. 100µl/Well des konjugierten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 42) wurde zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Platten 3x mit PBS-T-Puffer gewaschen. Dann wurden 100µl/Well TMB-Arbeitslösung, die kurz vor der Verwendung hergestellt wurde, zugegeben und exakt für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50µl 1M-Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der Platten wurde mit dem Plattenlesegerät FluoStart Omega durchgeführt (Messparameter: Messfilter 450nm, Referenzfilter 620 nm). Die Daten wurden mit dem Datenanalyseprogramm Mars Omega ausgewertet.

5.1.10 CRISPR-Klonierung

Zur Klonierung der sgRNA (#1425) in den Cas9 Vektor px333_eGFP_sgRNA 1504 (#375), wurden zunächst die Oligonukleotide phosphoryliert.

Tabelle 73: Phosphorylierung der Oligonukleotide für die CRISPR-Klonierung

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
Oligo 1 392	1 µl	100µM
Oligo 2 393	1 µl	100µM
PNK Buffer	1 µl	
T4 PNK	0,5 µl	
H ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 10µL	

Der Oligonukleotidmix wurde wie folgt inkubiert:

Tabelle 74: Temperaturprogramm für Oligonukleotidmix für die CRISPR-Klonierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Ramp Rate	Zyklen
Phosphorylierung	37°C	30 Minuten		1x
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	5°C/Minute auf 25°C	1x

Im nächsten Schritt wurde die sgRNA verdaut und neu verknüpft.

Tabelle 75: Bestandteile für Ligation

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
Vektor #375	0,9 µl	114,6ng/µL
Annealed Oligonukleotide	2 µl	0,4µM
Tango Buffer	2 µl	
FastDigest Bsal	1 µl	
T7 DNA Ligase	0,5 µl	
DTT	1 µl	10mM
ATP	1 µl	10mM
H ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

Der Mix wurde dann wie folgt inkubiert:

Tabelle 76: Temperaturprogramm für Ligation

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Verdau	37°C	5 Minuten	6x
Ligation	23°C	5 Minuten	

Im letzten Schritt wurde eine PlasmidSafe-Reaktion durchgeführt.

Tabelle 77: Bestandteile für Plasmid-Safe-Reaktion

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
Ligations-Reaktionsmix	11 µl	
PlasmidSafe Buffer 10X	1,5 µl	1x
ATP	1,5 µl	10mM
PlasmidSafe ATP-dependent DNase	1 µl	

Der Mix wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

5.1.11 Transformation in DH5 α -Bakterien

Anschließend wurde das klonierte Plasmid in chemisch-kompetente Bakterien transformiert. Hierfür wurden 2 μ L des Plasmids mit 50 μ L Bakteriensuspension, die zuvor auf Eis aufgetaut worden ist, gemischt. Die Mischung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 30 Sekunden bei 42°C geschockt. Danach wurde der Mix nochmals für 5 Minuten auf Eis gestellt. Es wurden 950 μ L LB-Medium hinzugefügt und für 1h bei 37°C und 250rpm geschüttelt. Danach wurden 50 μ L, 150 μ L und 800 μ L auf Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Es wurden 2 Kolonien am nächsten Tag herausgepickt und in 5mL LB-Medium mit 5 μ L Ampicillin (100mg/mL) über Nacht kultiviert. Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurde ein Glycerolstock erstellt. Hierfür wurden 850 μ L der Bakterienkultur mit 150 μ L Glycerol gemischt und gevortext. Die Mischung wurde daraufhin bei -80°C gelagert. Die restliche Bakterienkultur wurde im nächsten Schritt zur Plasmid Isolierung aufgereinigt.

5.1.12 Plasmid Isolierung

Das PureYield™ Plasmid MiniPrep System Kit (siehe Tabelle 43) wurde zur Isolierung des Plasmids verwendet. Im ersten Schritt wurden die Bakterien für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und in 600 μ L Nuklease-freiem H₂O resuspendiert. Die Suspension wurde mit 100 μ L Cell Lysis Buffer durch 6-maliges Invertieren gemischt. Im Anschluss wurde 350 μ L Neutralization Solution hinzugegeben, erneut durch Invertieren gemischt und für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die PureYield™ Minicolumn gegeben und abermals für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde 200 μ L Endotoxin Removal Buffer (ERB) auf die Säule gegeben und erneut für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Als nächstes wurde mit 400 μ L Column Wash Solution (CWC) gewaschen und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein neues Eppendorf-Röhrchen gesetzt, 60 μ L Nuklease-freies H₂O wurden auf die Säule gegeben und nach einer Inkubation von 1 Minute bei Raumtemperatur wurde das Plasmid eluiert, indem für 30 Sekunden bei 12.000 g zentrifugiert wurde. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Gewinnung größerer Mengen, wurde das PureYield™ Plasmid MidiPrep System Kit (siehe Tabelle 43) verwendet. Dafür wurde die Bakterienkultur ebenfalls im ersten Schritt pelletiert, indem für 10 Minuten bei 4.000g zentrifugiert und in 6ml Cell Resuspension Solution resuspendiert wurde. Dann wurde 6ml Cell Lysis Solution hinzugegeben und durch 5-maliges Invertieren gemischt. Nach einer Inkubation von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurden 10ml Neutralization Solution hinzugefügt, ebenfalls durch Invertieren gemischt und anschließend zentrifugiert für 15 Minuten bei 12.000g. Das Lysat wurde auf die blaue PureYield™ Clearing Column gegeben, die auf eine weiße PureYield™ Binding Column gesteckt wurde. Dann wurde das Lysat mithilfe des angelegten Vakuums durch beide Säulen gezogen. Die PureYield™ Clearing Column wurde entfernt und die Säule erst mit 5ml Endotoxin Removal Wash und dann mit 20ml Column Wash Solution gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule für 60 Sekunden getrocknet, um das Ethanol der Wash Solution zu entfernen. Im letzten Schritt wurde ein Eppendorf-Röhrchen und die Säule in den Eluator™ Vacuum Elution Device nach Herstellerangaben eingespannt und 500µl Nuklease-freies H₂O auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Elution ebenfalls über das angelegte Vakuum. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.1.13 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob das Plasmid das gewünschte Insert enthält, wurde ein Restriktionsverdau wie folgt angesetzt und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert:

Tabelle 78: Bestandteile für Restriktionsverdau

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
Tango buffer (10x)	2 µl	1x
Bsal	0,5 µl	20U/µL
BshTI	0,5 µl	20U/µL
DNA	2 µl	ca. 500 ng
H ₂ O	Auf ein Gesamtvolumen von 20µL	

5.1.14 Sequenzierung

Um die erfolgreiche Klonierung zu überprüfen oder das PCR-Produkt zu analysieren, wurde die DNA zum Sanger-Sequenzieren geschickt. Dafür wurde das Mix2Seq ON Kit (siehe Tabelle 43) von Eurofins verwendet. Hierfür wurden 5µL des Primers 237 (5pmol/µL) mit 5µL des Plasmids gemischt. Die Analyse erfolgte am nächsten Tag über Benchling.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Zellzählung

Zu Ermittlung einer Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer genutzt. Hierfür wurden 10µL Zellsuspension in die Kammer pipettiert und die vier Großquadrate ausgezählt. Bei sehr großen Zellzahlen wurde die Zellsuspension zunächst 1:10 in Trypan Blue verdünnt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times 10.000 \times \text{Verdünnung} = \text{Zellen/mL}$$

5.2.2 Auftauen von PGCs

Die verwendeten Zellen wurden standardmäßig in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert. Zum Auftauen wurden diese zunächst in ein Wasserbad bei 37°C überführt. Kurz vor dem vollständigen Auftauen der Zellen, wurden diese in ein 50mL Falcon überführt. Tropfenweise wurden 25mL kaltes Manipulation Medium unter ständigem Schütteln zu den Zellen hinzugefügt. Danach wurden die Zellen bei 230g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Manipulation-Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5mL PGC-Medium resuspendiert und in eine T25-Flasche überführt.

5.2.3 Kultivierung von PGCs

PGCs sind Keimzellen, aus denen sich Sperma- oder Eizellen entwickeln. Somit handelt es sich um Primärzellen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ dreimal wöchentlich kultiviert. Hierfür wurden sie zunächst gezählt, anschließend für 10 Minuten bei 230g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden dann in 2/3 neuem Medium und 1/3 konditionierten PGC-Medium aus dem Überstand resuspendiert.

Montags und mittwochs wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 125.000 Zellen/mL und freitags auf 100.000 Zellen/mL ausgesät.

5.2.4 Transfektion von PGCs

Zunächst wurden die Zellen gezählt und 5×10^6 Zellen durch eine 10-minütige Zentrifugierung bei 230g pelletiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen in 1mL PBS resuspendiert und in ein 1,5mL Eppendorf Tube überführt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugierung für 4 Minuten bei 230g pelletiert und das PBS abgesaugt. Dann wurden die Zellen in 100 μ L Nucleofector mit Zusätzen (1:4,5 Verdünnung) resuspendiert und jeweils 10 μ g Plasmid hinzugefügt. Der Mix wurde dann in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen werden dann bei 350V mit 8 Pulsen für 100 μ sec/Puls elektroporiert. Danach wurden 500 μ L PGC-Medium in die Küvette dazugegeben und die Zellen für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen in 2/3 neuem und 1/3 konditioniertem Medium kultiviert.

5.2.5 Selektion von PGCs mit Antibiotikum

Nach der Transfektion des Cre-ER^{T2}-Konstruktes wurden in zwei 48-Well Platten je 500 μ L der 5mL Zellsuspension gegeben. 48h nach der Transfektion des Cre-ER^{T2} Plasmids, welches eine Hygromycin B-Resistenz beinhaltet, wurden die Zellen durch die Zugabe von Hygromycin B selektiert. Dafür wurden zunächst 350 μ L Medium von oben aus dem Well entnommen und 150 μ L neues Medium + 100ng/mL Hygromycin B hinzugefügt. Bei der nächsten Kultivierung wurde die Konzentration des Hygromycin B halbiert auf 50ng/mL. Sobald die Einzelzellklone sich soweit expandiert haben, dass sie in eine 24-well Platte überführt werden konnten wurde die Hygromycin B Konzentration erneut um die Hälfte reduziert auf 25ng/ μ L.

5.2.6 Selektion von PGCs im Zellsorter

Nach der Transfektion des loxP TCR C β -Konstruktes wurden die 5mL Zellsuspension zunächst in eine T25-Flasche überführt. Das transient transfizierte Cas9 Plasmid enthält zusätzlich zur sgRNA, ein GFP-Gen. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen im

CytoFlex SRT nach GFP⁺ Zellen gesortet. Hierbei wurden zwei 48-well Platten mit Einzelzellklonen sortiert und zwei 24-well Platten mit gepoolten GFP⁺ Zellen aussortiert.

5.2.7 Kryokonservierung von PGCs

Pro Vial wurden 1×10^6 Zellen weggefroren. Hierfür wurden die Zellen gezählt und anschließend pelletiert. Die Zellen werden dann mit der Hälfte des Gesamtvolumens Manipulation Medium resuspendiert. Als nächstes wurde tropfenweise unter Schwenken des Falcons die andere Hälfte Manipulation Medium + 20% DMSO hinzugefügt. Anschließend wurde 2mL Zellsuspension in jedes Vial überführt und über Nacht in einer CoolCell Einfrierbox auf -80°C eingefroren. Danach wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff auf -196°C für die Langzeitlagerung eingefroren.

5.3 Tiere und Tierhaltung

Für die Tierversuche wurden weiße Leghorn-Hühner (Lohmann Selected White Leghorn, Lohmann-Tierzucht GmbH) verwendet. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern, Deutschland, genehmigt (ROB-55.2-2532.Vet_02-17-101, 55.2-1-54-2532-104-2015 & ROB-55.2-2532.Vet_02-21-47). Alle Experimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und den EU-Normen für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt. Alle Tiere erhielten eine handelsübliche Standardnahrung und Wasser ad libitum. Die Tiere werden standartmäßig unter spezifisch pathogen freien Bedingungen gehalten. Der Infektionsversuch mit Eimerien wurde am INRAE, Tours Frankreich, durchgeführt nach französischen Gesetzen und genehmigt von der französischen Kommission für Tierethik (VetBioNet VBN_21_61).

5.3.1 Erstellung von Keimbahn-Chimären

Primordiale Keimzellen (PGCs) mit der gewünschten genetischen Veränderung wurden in die Blutgefäße von 65 Stunden alten Embryonen injiziert. Die Embryos wurden daraufhin in eine Puteneierschale überführt und bis zum Schlupf bebrütet. Nach dem Schlupf wurde das Geschlecht der Küken mittels Geschlechtsbestimmungs-PCR bestimmt (siehe Methode 5.1.5.1). Die männlichen Küken werden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Die weiblichen Tiere wurden euthanasiert und die Gonaden auf Keimbahntransmission mittels Genotypisierungs-PCR (siehe Methode 5.1.5.5)

analysiert. Nach der Geschlechtsreife wurde das Sperma (siehe Methode 5.3.3) der Hähne für die DNA-Isolierung und Genotypisierung entnommen. Die Keimbahn-positiven Hähne wurden dann mit WT-Hennen verpaart, um heterozygote Tiere (F1-Generation) zu erhalten, und dann wurden Geschwister miteinander verpaart, um homozygote Tiere (F2-Generation) zu erhalten.

5.3.2 Inkubation von Eiern zum Schlupf der Hühner

Maximal drei Wochen alte Eier wurden bis zur Inkubation bei einer gleichmäßigen Temperatur von 16°C gelagert. Für die ersten 18 Tage werden die Eier bei 37,8°C und einer Luftfeuchte von 55% inkubiert. An Embryonaltag (ED) sieben und 18 werden die Eier geschiert, sodass tote und unbefruchtete Eier entnommen werden konnten. An ED18 wurden die Eier in den Hatcher überführt, der zunächst eine Temperatur von 37,2°C besitzt. An Tag 20 wurde die Luftfeuchtigkeit auf 80% erhöht und die Temperatur auf 37°C gesenkt. Beim Schlupf von Keimbahn-Chimären wurden die Tiere ab ED19 alle 4-5 Stunden kontrolliert und beim Schlupf geholfen, da sie nicht selbstständig aus der Puteneischale schlüpfen können. Am Tag des Schlupfes bekamen die Tiere eine Flügelmarkierung und Blut wurde genommen für die Geschlechtsbestimmung (siehe Methode 5.1.5.1) und Genotypisierung (siehe Methoden 5.1.5.2, 5.1.5.3).

5.3.3 Gewinnung von Sperma-Proben

Nach Einsetzen der Geschlechtsreife mit circa 15 Wochen wurden die Hähne zwei bis dreimal wöchentlich langsam an das Handling gewöhnt. Die Federn um die Kloake wurden mit einer Schere geschnitten, um die Kloake besser zu sehen und Verunreinigungen des Ejakulates zu verringern. Die Spermagewinnung erfolgte durch manuelle Massagetechnik. Dafür wurde der Hahn auf einer weichen Matte der Tischplatte platziert. Während eine Person die Beine mit einer Hand fixierte und mit der zweiten Hand den Rücken des Hahns massierte, massierte eine zweite Person die Abdominalregion ventral der Kloake durch vertikale Bewegungen. Sobald der Hahn die Schwanzfedern aufstellte und den medialen Phalluskörper ausstülpte, wurde durch die zweite Person mit einer Hand Druck auf die Bereiche seitlich der Kloake ausgeübt, sodass das Sperma mit der zweiten Hand in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aufgefangen werden konnte.

5.3.4 Wiegen der Tiere

Für das Wiegen der Tiere werden diese aus der Voliere genommen und in einen Käfig gesetzt, der auf einer Waage steht.

5.3.5 Blutabnahme

Küken wurden mittels Scherengriffs fixiert. Adulte Hühner wurden durch eine zweite Person an den Ständern fixiert und auf einen Tisch gelegt, und von der blutabnehmenden Person im Scherengriff fixiert. Das Gefieder wurde mit 70%igem Ethanol befeuchtet und an der Injektionsstelle gescheitelt. Mit dem Daumen wird die Jugularvene gestaut. Die Punktion erfolgt parallel zum Blutgefäß. Die Blutmenge für die Genotypisierung wurde so gering wie möglich, ca. 50µl, gehalten. Die Blutmenge für die Durchflusszytometrie richtet sich nach den Empfehlungen des GV-SOLAS und betrug nicht mehr als 1% der Gesamtblutmenge (6,5% des Körpergewichts).

5.3.6 Intravenöse Injektion für den adoptiven Transfer

Nachdem die gewünschten Zelltypen ($\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zellen) durch MACS isoliert wurden, wurden die Zellen gezählt und in der zulässigen Menge (1 ml/1 kg) PBS + 1% BSA gemäß der GV-SOLAS-Empfehlung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in die Empfängertiere durch Injektion in die Jugularvene injiziert. Hierfür wurde das Tier von einer zweiten Person an den Ständern festgehalten und auf den Tisch gelegt. Die injizierende Person fixiert den Hals mit dem Scherengriff und staut die Vena jugularis mit dem Daumen. Die Punktion erfolgte parallel zum Blutgefäß. Nach Aspiration mit der Spritze wurden die Zellen langsam und gleichmäßig injiziert.

5.3.7 Euthanasie zur Organentnahme

Embryos wurden aus dem Ei genommen und unmittelbar mit einer Schere dekapitiert. Tiere bis zu sieben Tage nach dem Schlupf wurden durch Genickbruch mit vorheriger Betäubung durch einen gezielten Schlag zum Hinterkopf euthanasiert. Adulte Hennen und Jungtiere wurden durch einen stumpfen Schlag zum Hinterkopf betäubt und ausgeblutet mittels distalem Ohrscheibenschnitt. Ausgewachsene Hähne wurden durch i.p. Injektion von Pentobarbital (400 mg/kg Körpergewicht) euthanasiert.

5.3.8 Ermittlung des Organ/Körpergewicht-Quotienten

Zur Ermittlung des Organ/Körpergewicht-Quotienten von Embryonen, wurden die Embryos zunächst aus dem Ei genommen und dekapitiert. Daraufhin wurde der dekapitierte Körper gewogen. Dann die jeweiligen Organe entnommen, die daraufhin auch gewogen wurde. Bei den bereits geschlüpften Küken wurde das Körpergewicht vor der Euthanasie bestimmt. Der Quotient wurde wie folgt berechnet.

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Gewicht Organ (kg)}}{\text{Körpergewicht (g)}}$$

5.3.9 Bestimmung des Läsionsscores

Ein Caecum wurde entnommen und longitudinal aufgeschnitten. Der Läsionsscore wurde nach Johnson et al. (1970) bestimmt [129]. Jedem Caecum wurde ein Score von 1-4 je nach Läsionsgrad vergeben.

Läsionsgrad 1: Es wurden nur sehr wenige verstreute Petechien an der Caecumwand beobachtet, keine Verdickung der Caecumwand und normaler Caecuminhalt vorhanden.

Läsionsgrad 2: Zahlreiche Läsionen und der Caecuminhalt war deutlich blutig, die Caecumwand ist etwas verdickt, trotzdem war normaler Caecuminhalt vorhanden.

Läsionsgrad 3: große Mengen Blut oder Läsionen an der Caecumwand vorhanden, starke Verdickung der Blinddarmwand und wenig oder gar kein Caecuminhalt.

Läsionsgrad 4: Die Caecumwand ist stark mit Blut oder großen Läsionen aufgebläht; Kot-Reste fehlen. Tote Vögel werden mit 4 bewertet.

5.3.10 Aerobe und mikroaerophile Kultivierung der Milz

Die Milzproben wurden mittels Hautbiopsiestanze aus vierzehn Tage alten TCR C β KO-Hühnern und ihren WT-Schlupfgeschwistern entnommen und daraufhin kultiviert. Für die aerobe Kultivierung wurden die gestanzten Milzstücke auf einem Teil der Typtone-Soya-Agar-Platte ausgestrichen und ein Verdünnungsausstrich gemacht. Die Platte wurde 48h bei 37°C inkubiert. Für die mikroaerophile Kultur wurde die Platte in einem Anaerobiertopf inkubiert und Aerocult A hinzugefügt. Die mikroaerophile Kultur wurde ebenfalls für 48h bei 37°C inkubiert.

5.3.11 *In ovo* Methoden

5.3.11.1 Allantois-Entnahme

Für die *in ovo*-Genotypisierung wurde Allantois aus dem Ei an ED10 entnommen. Die Allantois-Flüssigkeit ist Teil der schützenden Umgebung des Eies und enthält DNA. Zunächst wurden die Eier mithilfe einer Schierlampe untersucht, um eine Stelle für die Entnahme zu bestimmen. Diese sollte möglichst unterhalb der Luftblase zwischen den Blutgefäßen liegen, sodass diese nicht beeinträchtigt werden durch die Entnahme. Mithilfe eines Meißels wurde die Schale leicht angepickt. Mittels Insulinspritzen (30G Nadeln) wurde dann durch das Loch ca. 5µL Allantois Flüssigkeit entnommen.



Abbildung 19: Markierung einer geeigneten Stelle zur Allantois Entnahme eines Embryos an ED10 zur *in ovo* Genotypisierung.

5.3.11.2 *In ovo* Blutentnahme/Injektion

Zunächst wurden 1mL-Spritzen mit 27G Kanülen zur Antikoagulation heparinisiert. Dafür wurde Heparin in RPMI-Medium (250 I.E./ml) verdünnt und die Spritzen einmal mit der Lösung gespült. Ein Ei wurde aus dem Inkubator entnommen und mit der Luftblase an der stumpfen Seite zur Schierlampe hin in den Halter gelegt und gedreht, um alle Gefäße darzustellen. Ein geeignetes Blutgefäß ohne viele Verästelungen, wurde mit einem Dreieck markiert. Die Spitze des Dreiecks zeigte dabei in die Richtung des Blutstroms. Dann wurden die zuvor ausgewählten Dreiecke mit dem Dremel (Geschwindigkeit 6-8) in

die Schale geschnitten, ohne die Membran zu zerstören. Die Schale wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze entfernt. Das Ei wurde zurück in die Halterung eingeklemmt an die Schierlampe. Mit einer Pipettenspitze wird ein Tropfen Paraffinöl auf die Membran gegeben, um die Vene besser darzustellen. Daraufhin wurde mit der heparinisierten Spritze Blut entnommen beziehungsweise Zellen nach Aspiration injiziert. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen umgefüllt. Nach der Entnahme wurde das Dreieck mit Klebeband abgedeckt und das Ei wieder in den Inkubator gelegt.



Abbildung 20: Darstellung einer geeigneten Vene eines Embryos an ED12 zur in ovo Blutabnahme beziehungsweise Injektion. Mittels Dremel wird ein Dreieck in die Eischale geschnitten und mithilfe einer 30G Nadel injiziert / Blut entnommen.

5.3.12 Experimenteller Ablauf der adoptiven Transfereexperimente

Im ersten adoptiven Transfer Experiment wurden $\gamma\delta$ T-Zellen von mCherry⁺ Spendertieren in TCR C γ KO-Hühner transferiert. Hierfür wurden Spender-und Empfängertiere unmittelbar nach dem Schlupf genotypisiert und der MHC-Halpotyp bestimmt. Im Alter von 4 Wochen wurden PBMCs der mCherry⁺ Spendertieren isoliert (siehe Methode 5.1.6.1) und mittels MACS die TCR1⁺ T-Zellen selektiert (siehe Methode 5.1.6.4). Die Zellen wurden unmittelbar danach in vier Wochen alte TCR C γ KO-Hühner injiziert. Dafür wurde das Huhn im Scherengriff fixiert und die Zellsuspension wurde durch eine 1mL Spritze mit 27G Kanüle nach vorherigem aspirieren, zur Lagekontrolle der Kanüle, injiziert. Sechs Tage vor der Injektion wurde zur Kontrolle ein FACS von den KO-Tieren gemacht. An

Tag 3, 8, 11, 15, 22 und 35 nach dem Transfer wurde mittels FACS die Anwesenheit von TCR1⁺ mCherry Zellen im Blut der Empfänger Hühner überprüft. An den Tagen 11 und 35 nach Transfer wurden von einigen Tieren Milz und Thymus entnommen, die ebenfalls mittels FACS auf TCR1⁺mCherry Zellen untersucht wurden.

1) adoptive Transfer in TCR C γ ^{-/-}

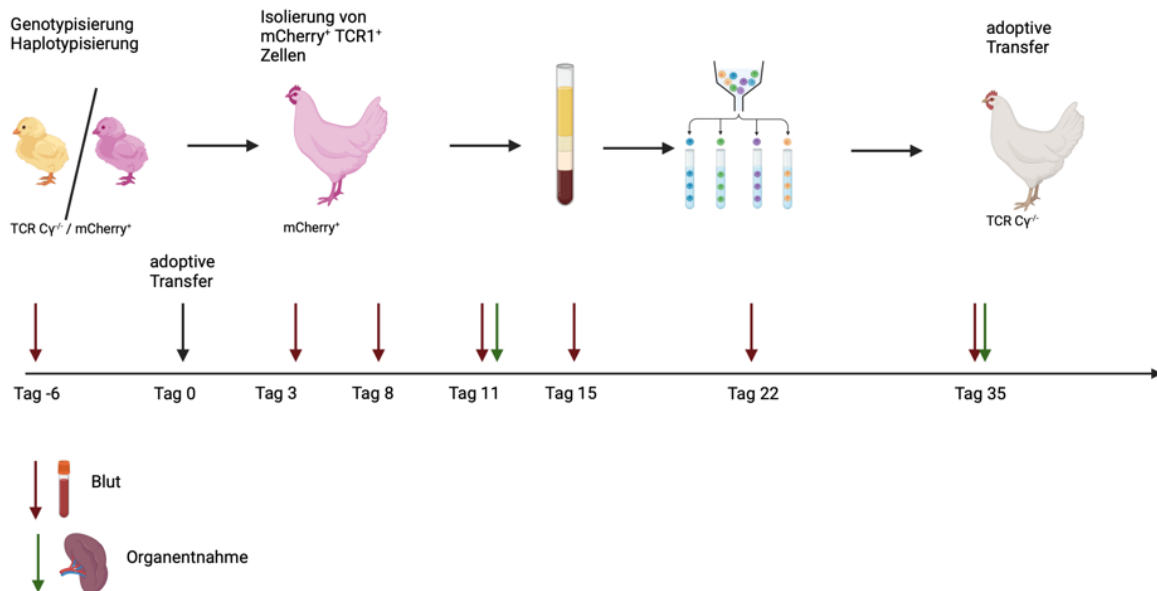


Abbildung 21: Experimenteller Ablauf des adoptiven Transfer in TCR C γ KO-Hühner. Zunächst wurden Spender- und Empfängertiere genotypisiert, dann wurden aus dem Spendertier PBMCs isoliert und in die Empfängertiere transferiert. Blutentnahmen erfolgten an den Tagen -6, 3, 8, 11, 15, 22, 35. Organentnahmen erfolgten an den Tagen 11 und 35.

Im zweiten adoptiven Transfer Experiment wurden $\alpha\beta$ T-Zellen von mCherry⁺ Spendertieren in TCR C β KO-Hühner transferiert. Hierfür wurden Spender- und Empfängertiere unmittelbar nach dem Schlupf genotypisiert und der MHC-Haplotyp bestimmt. Im Alter von einer Woche wurden von dem mCherry⁺-Spendertieren entweder PBMCs, Thymus oder Milz isoliert (siehe Methode 5.1.6.1) und dann mittels MACS TCR2+3⁺ T-Zellen aussortiert (siehe Methode 5.1.6.4). Die Zellen wurden unmittelbar danach in sieben Tage alte TCR C β KO-Hühner injiziert. Dafür wurde das Huhn im Scherengriff fixiert und die Zellsuspension wurde durch eine 1mL Spritze mit 27G Kanüle nach vorherigem aspirieren injiziert. Ein Tag vor der Injektion wurde zur Kontrolle ein FACS von den KO-Tieren gemacht. An Tag 3, 7, 8 und 14 nach dem Transfer wurde mittels FACS die Anwesenheit von TCR2+3⁺ mCherry-Zellen im Blut der Empfänger-Hühner überprüft. An den Tagen 8 und 14 nach Transfer wurden ein einigen Tieren Milz und Thymus genommen, die ebenfalls mittels FACS auf TCR2+3⁺mCherry Zellen untersucht wurden.

2) adoptive Transfer in TCR C β ^{-/-}

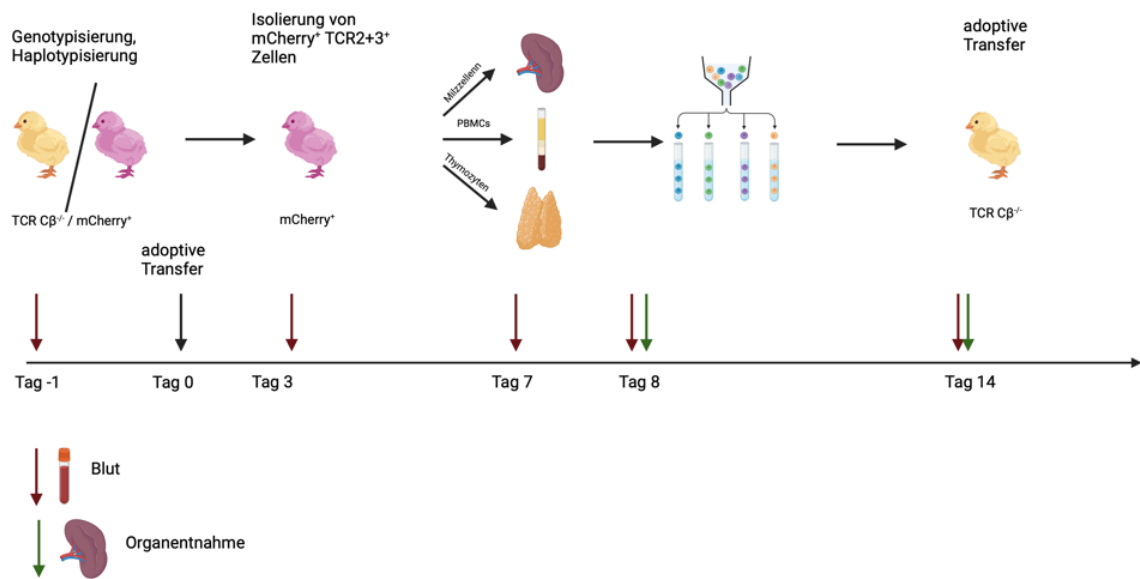


Abbildung 22: Experimenteller Aufbau des adoptiven Transfer in TCR C β KO. Zunächst wurden Spender- und Empfängertiere genotypisiert, dann wurden aus dem Spendertier PBMCs, Thymus und Milz isoliert und in die Empfängertiere transferiert. Blutentnahmen erfolgten an den Tagen -1, 3, 7, 8 und 14. Organentnahmen erfolgten an den Tagen 8 und 14.

Im dritten adoptiven Transferexperiment wurden Thymozyten von mCherry⁺ Spenderembryos in TCR C β KO-Embryos transferiert. Hierfür wurden die Empfängertiere mittels Allantois an ED10 genotypisiert. An Embryonaltag (ED) 19 wurden von dem mCherry⁺ Spendertieren Thymozyten isoliert. Die Zellen wurden unmittelbar danach ED12 alte TCR C β KO-Embryos injiziert. 7 Tage nach dem Transfer wurde mittels FACS die Anwesenheit von TCR2⁺3⁺ mCherry Zellen im Blut und im Thymus der Empfängerhühner überprüft.

3) *in ovo* adoptive Transfer in TCR C β ^{-/-}

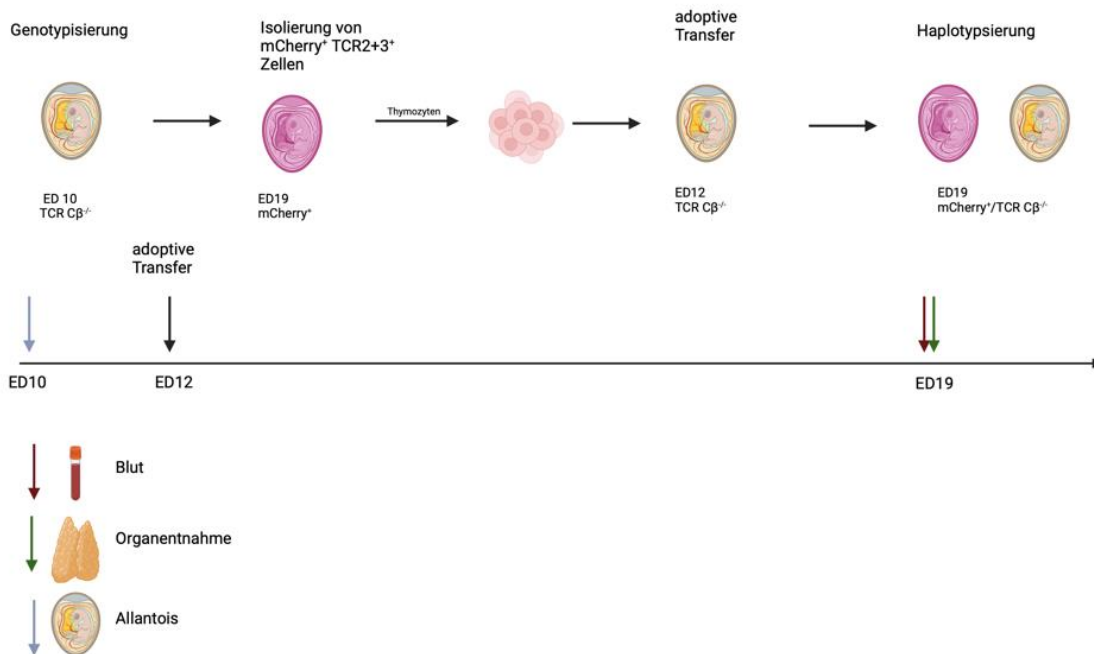


Abbildung 23: Experimenteller Ablauf des *in ovo* adoptiven Transfers in TCR C β KO-Embryos. Zunächst wurden Spender- und Empfängertiere an ED10 genotypisiert, dann wurden aus dem Spendertier Thymozyten isoliert und in die Empfängertiere an ED12 transferiert. Blutentnahme und Organentnahme erfolgte an den ED19.

5.3.13 Experimenteller Ablauf der Infektionsexperimente mit *Eimeria tenella*

Sowohl die Primärinfektion als auch das Challenge Experiment wurden am INRAE (Tours Frankreich) durchgeführt. Die Organe für die Histologie wurden von INRAE eingebettet und dann zur TUM School of Life Science, Weihenstephan, Freising für die Färbung und Analyse geschickt. Die durchflusszytometrische Messung Lymphozyten im Caecum wurde ebenfalls am INRAE durchgeführt. Die Analyse der Rohdaten und Statistik wurden dann an der TUM durchgeführt.

Für die Primärinfektion wurden den Tieren einen Tag nach dem Schlupf Blut abgenommen, welches zur Genotypisierung an die TUM geschickt wurde. Im Alter von vierzehn Tagen wurde die Infektionsgruppe mit 1.000 Oozyten pro Tier per os inokuliert. Die Kontrollgruppe wurde nicht infiziert. Sieben Tage später wurden die Tiere euthanasiert. Das Caecum wurde entnommen und der Läsionsscore bestimmt. Der caecale Inhalt wurde für die Bestimmung der Oozytenzahl entnommen. Ein Caecum wurde für die Histologie eingebettet. Beim zweiten Caecum wurde die Muskosa mit einem Skalpell abgekratzt für die Durchflusszytometrische Analyse.

1) Primärinfektion

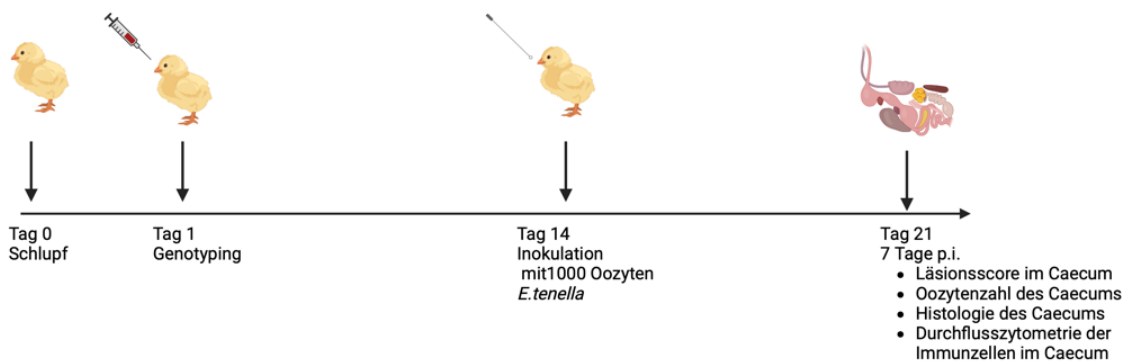


Abbildung 24: Experimenteller Aufbau der Primärinfektion mit *Eimeria tenella*. Die Tiere wurden einen Tag nach dem Schlupf genotypisiert. 14 Tage nach dem Schlupf wurden die mit 1000 Oozyten *Eimeria tenella* inokuliert. Sieben Tage später wurden die Tiere euthanasiert und das Caecum der Tiere zur Analyse entnommen.

Für das Challenge Experiment wurden den Tieren einen Tag nach dem Schlupf Blut abgenommen, welches zur Genotypisierung an die TUM School of Life Science, Weihenstephan, Freising geschickt wurde. Im Alter von 14 Tagen wurde die Challenge Gruppe mit 500 Oozyten pro Tier per os inokuliert. Die Kontrollgruppe wurde nicht infiziert. An Tag 35 wurden daraufhin alle Tiere mit einer hohen Dosis von 10.000 Oozyten per os inokuliert. Sieben Tage später wurden die Tiere euthanasiert. Das Caecum wurde entnommen und der Läsionsscore bestimmt. Der caecale Inhalt wurde für die Bestimmung der Oozytenzahl entnommen. Ein Caecum wurde für die Histologie eingebettet. Beim zweiten wurde die Muskosa mit einem Skalpell abgekratzt für die Durchflusszytometrische Analyse.

2) Challenge Experiment

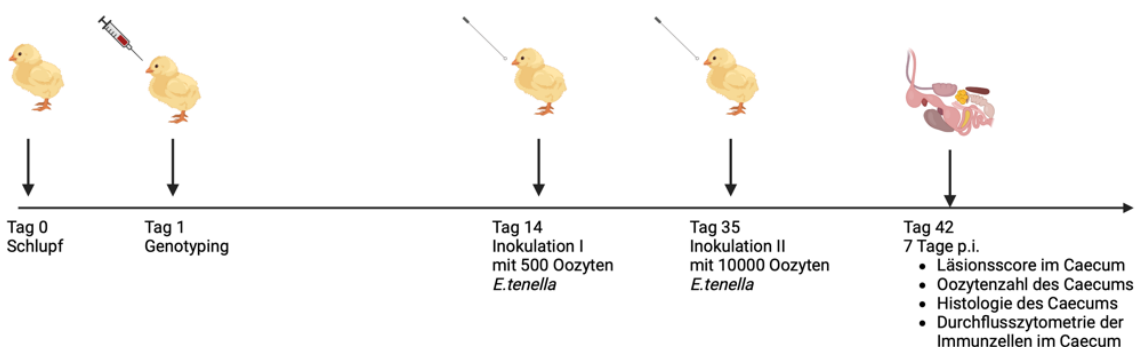


Abbildung 25: Experimenteller Ablauf des Challenge Experiments mit *Eimeria tenella*. Die Tiere wurden einen Tag nach dem Schlupf genotypisiert. 14 Tage nach dem Schlupf wurden sie mit 500 Oozyten *Eimeria tenella* inokuliert. Elf Tage später wurden ein Teil dieser Tiere erneut mit 10.000 Oozyten gechallenged. An Tag 42 wurden die Tiere euthanasiert und das Caecum der Tiere zur Analyse entnommen.

6 Ergebnisse

6.1 TCR C β Knockout-Hühner zeigen einen schwerwiegenden Phänotyp

Reverse Genetik ist eine etablierte Methode zur Deletion von Genregionen, um nachfolgend die Rolle bestimmter Gene zu entschlüsseln. Um die Bedeutung der $\alpha\beta$ T-Zellen in Hühnern genauer zu beschreiben, wurden Hühner generiert, die eine Knockout der konstanten Region der β -Kette des T-Zell-Rezeptors besitzen. Diese Hühner wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht.

6.1.1 Etablierung der TCR C β Knockout-Huhn-Genotypisierung

Zur Unterscheidung von Wildtyp-, heterozygoten TCR C β ^{+/-}- und homozygoten TCR C β ^{-/-}-Tieren, wurden zwei Primerpaare designt. Der Forward Primer #426 ist dabei gleich für beide Paare, da er außerhalb der konstanten Region der β -Kette liegt. Der Reverse Primer #1172 für den Wildtyp-Locus liegt innerhalb der konstanten Region der β -Kette. Der Reverse Primer #223 für den Knockout liegt auf dem DNA-Template hinter der ausgeknockten „Loop out“-Region und vor der Neomycin-Resistenzkassette (siehe Abbildung 26).

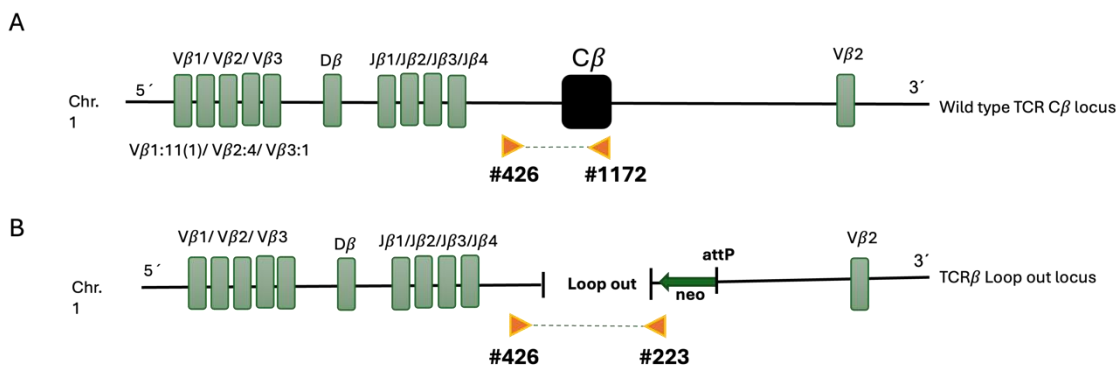


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer für eine Genotypisierungs-PCR. A) Der Forward Primer #426 zur Bestimmung von WT-Hühnern auf dem TCR C β -Locus liegt kurz vor der konstanten Region, während der Reverse Primer #1172 innerhalb der konstanten Region liegt. Die Primer erzeugen eine Amplikonlänge von 313 bp. B) Derselbe Forward Primer #426 wurde ebenfalls für die Bestimmung des TCR C β Knockouts eingesetzt. Der Reverse Primer #223 liegt hinter der Loop out-Region. Die Primer erzeugen eine Amplikonlänge von 679bp. *Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].*

Das WT-Amplikon beträgt 313bp, während das TCR C β KO-Amplikon 679bp beträgt. Die Amplikons unterscheiden sich somit um circa 350 Basenpaare, wodurch es möglich ist

eine gemeinsame PCR zu etablieren, in welcher zwischen WT-, heterozygoten TCR C β ^{+/-}- und homozygoten TCR C β ^{-/-}-Hühnern in einer Reaktion unterteilt werden kann (siehe Abbildung 27)

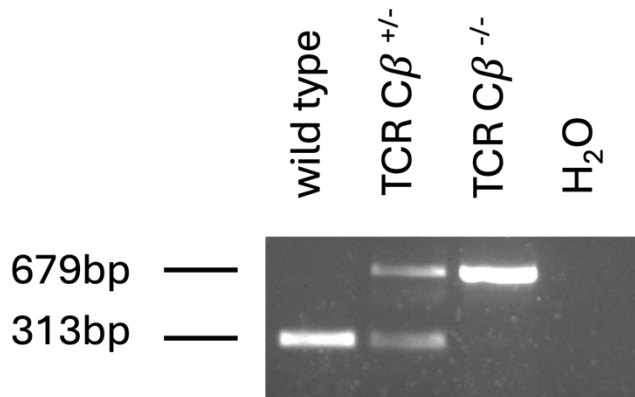


Abbildung 27: Genotypisierungs-PCR zur Unterscheidung von Wildtyp-, TCR C β ^{+/-}- und TCR C β ^{-/-}-Hühnern. gDNA wird mittels der quick and dirty Isolierung aus Blut gewonnen. Die PCR zeigt den Unterschied zwischen einem Wildtyp-Tier, der eine Bande bei 313bp zeigt, einem KO-Tier, das eine Bande bei 679bp zeigt und einem heterozygoten Tier, welches beide Banden zeigt. Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

6.1.2 Normale Entwicklung der lymphatischen Organe von TCR C β KO-Embryonen an ED18

Zunächst wurde der Phänotyp der TCR C β KO-Tiere im Embryo analysiert. Hierfür wurden Eier bis ED18 inkubiert. Der Genotyp der Embryos wurde durch Isolierung von gDNA aus Gewebe bestimmt (siehe Methoden 5.1.1.3, 5.1.5.2, 5.1.5.7). Thymus, Milz und Bursa wurden für eine histologische Beschreibung entnommen. Die Ermittlung des Organ/Körpergewicht-Quotienten ergab keine Unterschiede zwischen den TCR C β KO-Tieren und WT-Tieren (siehe Abbildung 28).

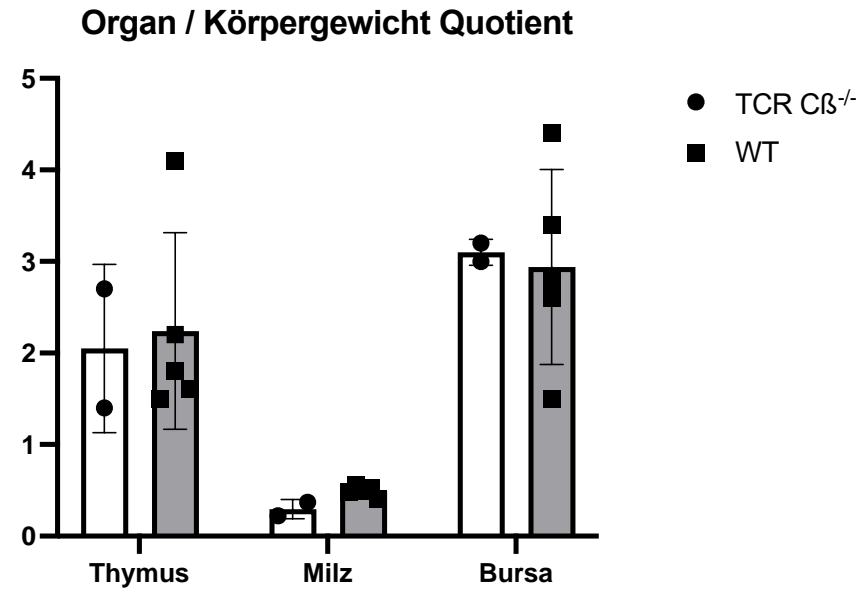


Abbildung 28: Organ-Körpergewicht-Quotient von Thymus, Milz und Bursa an ED18. Die dekapitierten Körper von zwei TCR C β KO- und 5 Wildtypembryos wurden gewogen. Thymus, Milz und Bursa, wurden aus Embryos entnommen und ebenfalls gewogen. Der Quotient wurde bestimmt aus Organ (mg)/ Körpergewicht (g). Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten. Statistische Analyse nicht möglich, da nur n=2 KO-Tieren vorhanden.

Beim histologischen Vergleich der lymphatischen Organe an ED18 konnten keine strukturellen Unterschiede in Thymus, Milz und Bursa zwischen TCR C β KO- und WT-Tieren festgestellt werden (siehe Abbildung 29).

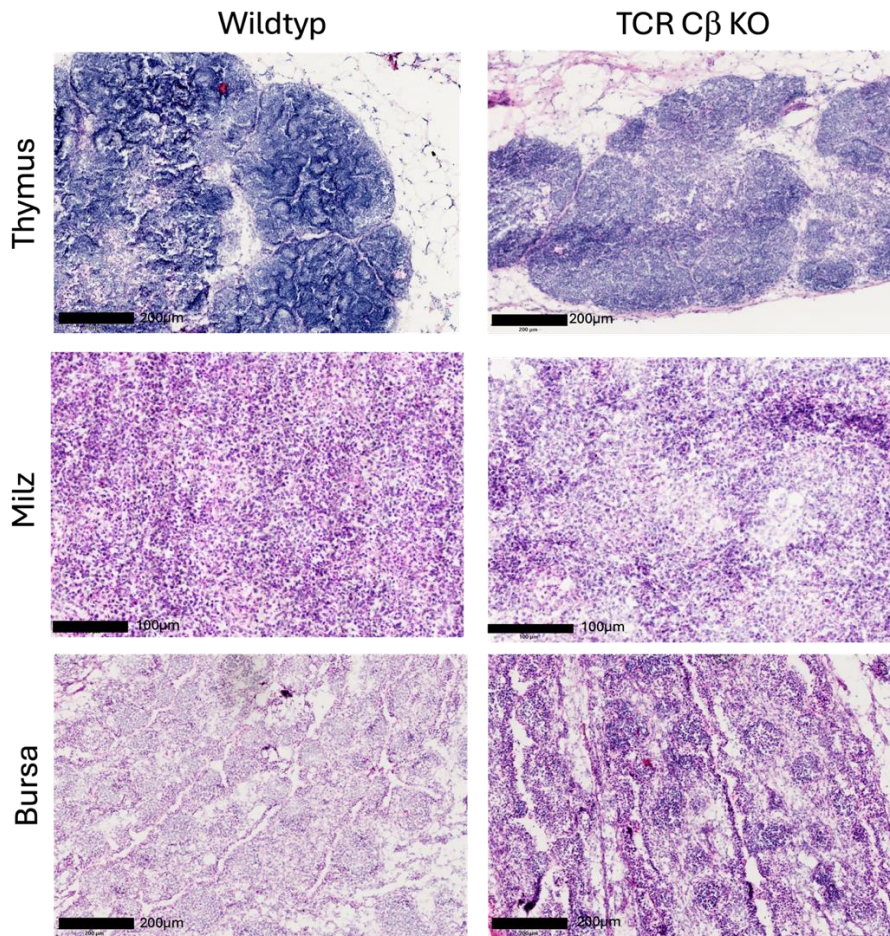


Abbildung 29: Histologische Analyse von TCR C β KO-Hühnern. (A) Schnitte des Thymus, der Milz und der Bursa von ED18 alten WT- und TCR C β KO-Hühnern wurden präpariert und mit H&E gefärbt. Es wird jeweils ein repräsentatives Bild von mindestens zwei verschiedenen Tieren pro Genotyp gezeigt. Maßstabsbalken von Thymus und Bursa = 200 μ m; Milz = 100 μ m.

6.1.3 Ausgeprägte Granulom-Bildung bei TCR C β KO-Tieren zwei Wochen nach Schlupf

Bereits zwei Wochen nach dem Schlupf zeigen die TCR C β KO-Tiere einen ausgeprägten Phänotyp. Sie erscheinen kleiner und ihre Haltung ist gedrunken. Bei der Obduktion der Tiere wurden Granulome an Ständern, Schnäbeln und Kamm gefunden. Zudem waren Milz und Muskelmagen deutlich verdickt. Die Milz zeigte eitrige Entzündungsherde. Die Bursa erscheint kleiner im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren und der Thymus ist unterentwickelt (siehe Abbildung 30).

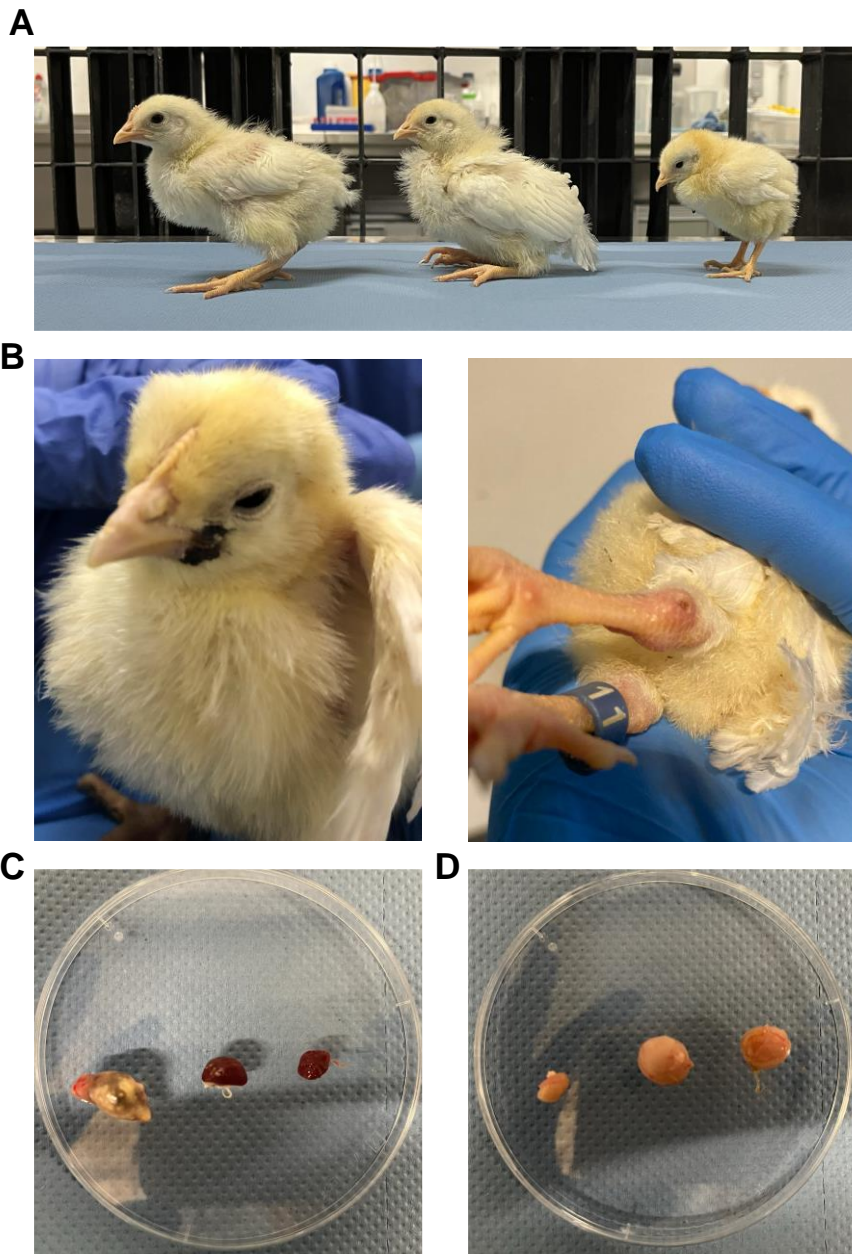


Abbildung 30: Äußeres Erscheinungsbild der TCR C β KO-Tiere vierzehn Tage nach dem Schlupf zeigt einen ausgeprägten Phänotyp. A) Abbildung eines von links nach rechts WT, TCR C γ ^{-/-} und TCR C β ^{-/-} Huhns. B) Die Abbildung zeigt die Granulom-Bildung am Schnabel und an den Ständern eines TCR C β KO-Tieres. C) +D) Die Abbildung zeigt von links nach rechts eine Milz (C) und eine Bursa (D) eines TCR C β ^{-/-}, TCR C γ ^{-/-} und eines WT-Huhns. Abbildung adaptiert von Heyl et al (2023) [91].

Das Körpergewicht der TCR C β KO-Tiere liegt unterhalb von dem Gewicht der Wildtyp-Hühner an allen Zeitpunkten. Der größte Unterschied ist an Tag zehn zu sehen, die TCR C β KO-Tiere wiegen hier im Durchschnitt 57,6g (\pm 8,54g), während die WT-Tiere 67,28g (\pm 8,32g) wiegen. Sie unterscheiden sich allerdings an keinem Zeitpunkt signifikant (siehe Abbildung 31).

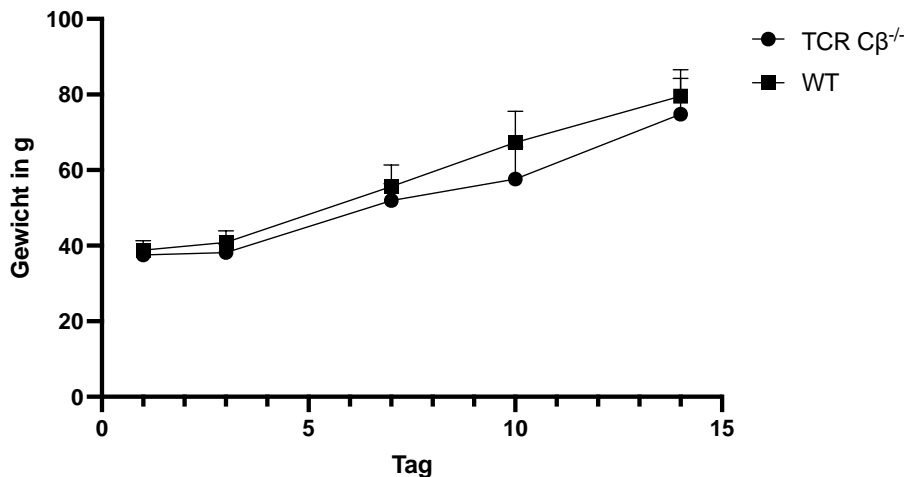


Abbildung 31: Gewichtskurve der TCR C β KO-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Hühnern. Das Gewicht der TCR C β KO- und WT-Tiere wurde an Tag 1, 3, 7, 10 und 14 nach dem Schlupf bestimmt. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($n \geq 4$, $*p < 0,05$, Multiple t-Test). Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

Der Organ-Körpergewichts-Quotient vierzehn Tage nach Schlupf zeigt, dass die Milz von den TCR C β KO-Tieren im Durchschnitt $2,02 (\pm 0,80)$ ist und damit größer als der Durchschnitt der Wildtyp-Tiere mit $1,69 (\pm 0,38)$. Die Messung der Bursa ergab bei den TCR C β KO-Tieren ein geringeres Bursa-Gewichtverhältnis von $1,71 (\pm 0,89)$ im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit $2,50 (\pm 0,29)$ nach vierzehn Tagen. Die Verhältnisse der beiden Organe unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Schlupfgeschwistern (siehe Abbildung 32).

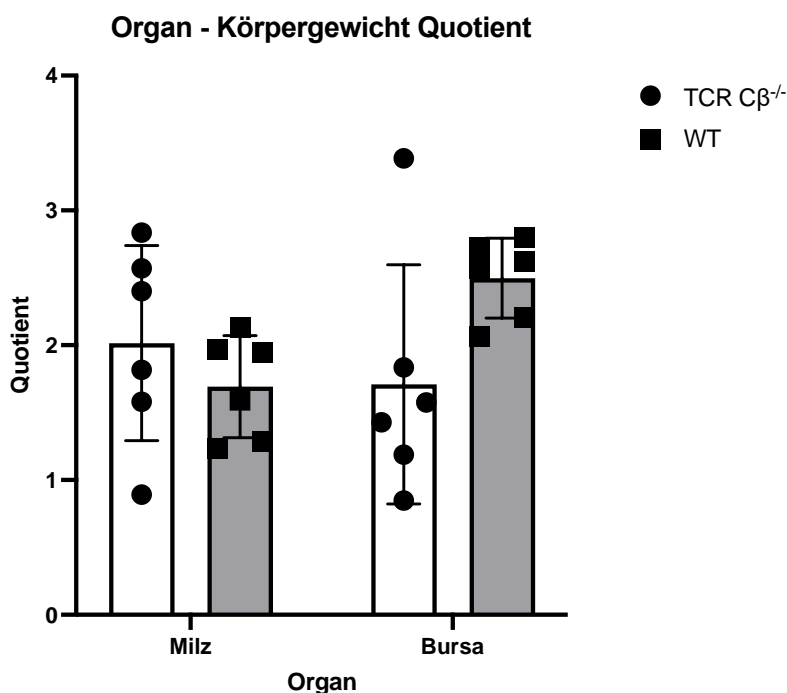


Abbildung 32: Organ-Körpergewicht-Quotient von Milz und Bursa der TCR C β KO-Hühner im Vergleich zu WT-Tieren. Die Tiere wurden an Tag vierzehn nach dem Schlupf gewogen. Die Milz und Bursa von sechs TCR C β KO- und sechs WT-Hühnern wurden entnommen und gewogen. Der Quotient wurde bestimmt aus $\text{Organ (mg)} / \text{Körpergewicht (g)}$. Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($n=6$, $*p < 0,05$, t-Test).

6.1.4 Fehlende Kompensation des $\alpha\beta$ T-Zell-Verlustes durch $\gamma\delta$ T-Zellen in TCR C β KO-Hühnern

Die vollständige Depletion der $\alpha\beta$ T-Zellen in den TCR C β Knockout-Hühnern wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 33 zeigt bei der Färbung von CD3 und TCR1, dass die CD3⁺ $\gamma\delta$ T-Zell-Population in WT- und in TCR C β KO-Tieren gleich ist, während keine weitere CD3⁺ Zellpopulation in den TCR C β KO-Tieren vorhanden ist im Gegensatz zu den WT-Hühnern. Bei der Färbung von CD3 und TCR2+3 konnten in den TCR C β KO-Hühnern keine $\alpha\beta$ T-Zellen gefunden werden. Die CD3⁺ Population entspricht der $\gamma\delta$ T-Zell Population, die auch im WT-Huhn vorhanden ist (siehe Abbildung 33).

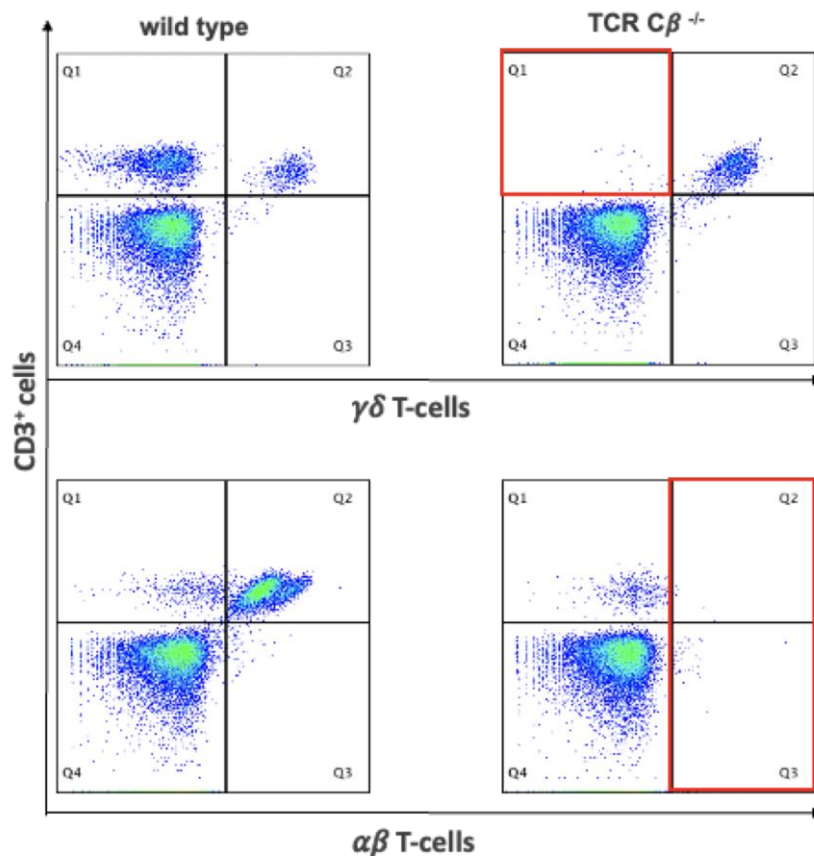


Abbildung 33: Bestätigung des Knockouts via Durchflusszytometrie. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen durchflusszytometrischen Dotplot eines WT- und TCR C β ^{-/-}-Tieres (Tag 14; n = 10). Zur Detektion von T-Zellen wurde der pan-T-Zell-Marker CD3 (Klon CT3) -PacBlue verwendet. Außerdem wurden die, $\gamma\delta$ T-Zellen mit dem Antikörpern TCR1-APC und $\alpha\beta$ T-Zellen mit einer Kombination aus den Antikörpern TCR2+TCR3-APC detektiert. Die roten Boxen kennzeichnen die Quartile in denen im Vergleich zu WT-Tieren keine $\alpha\beta$ T-Zellpopulation zu sehen ist. Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

Weder an Tag sieben noch an Tag vierzehn zeigten die TCR C β KO-Hühner Unterschiede in der Frequenz von $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu WT-Tieren. Dagegen haben die TCR C β KO-Hühner signifikant (p=0,006490) weniger B-Zellen (0,79 ±0,44 Bu1⁺ Zellen in 100 Single

Zellen) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($1,63 \pm 0,61$ Bu1⁺ Zellen in 100 Single Zellen) vierzehn Tage nach dem Schlupf. Mit $5,76 (\pm 2,18)$ Monozyten pro 100 Single Zellen in den TCR C β KO-Tieren im Vergleich zu $0,628 (\pm 0,38)$ Monozyten pro 100 Single Zellen in den Wildtyp-Tieren, wurden signifikant ($p=0,000081$) mehr Monozyten nach zwei Wochen im Vergleich zu den genetisch unveränderten Schlupfgeschwistern gemessen (siehe Abbildung 34A). Durch den Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen, wurde ebenfalls signifikant weniger CD4⁺ (Tag 7 $p=0,000158$; Tag 15 $p<0,000001$) und CD8⁺ T-Zellen (Tag 7 $p=0,000284$; Tag 15 $p=0,000467$) gemessen. Allerdings sind in der $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulation signifikant mehr CD8^{high}-Zellen in den TCR C β KO-Tieren im Vergleich zu WT-Hühnern sowohl an Tag sieben ($p=0,004809$) als auch und Tag fünfzehn ($p=0,003193$) zu finden. Auch bei der CD8^{dim}-Population innerhalb der TCR1⁺ T-Zellen wurden signifikant mehr Zellen an Tag sieben ($p=0,000512$) und Tag fünfzehn ($p=0,019047$) in den TCR C β KO-Tieren gefunden. In der Doppelpositiven CD8^{dim}CD4⁺-Population innerhalb der $\gamma\delta$ T-Zellen wurden signifikant ($p=0,0048$) weniger Zellen in den TCR C β KO-Tieren gemessen als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 34B).

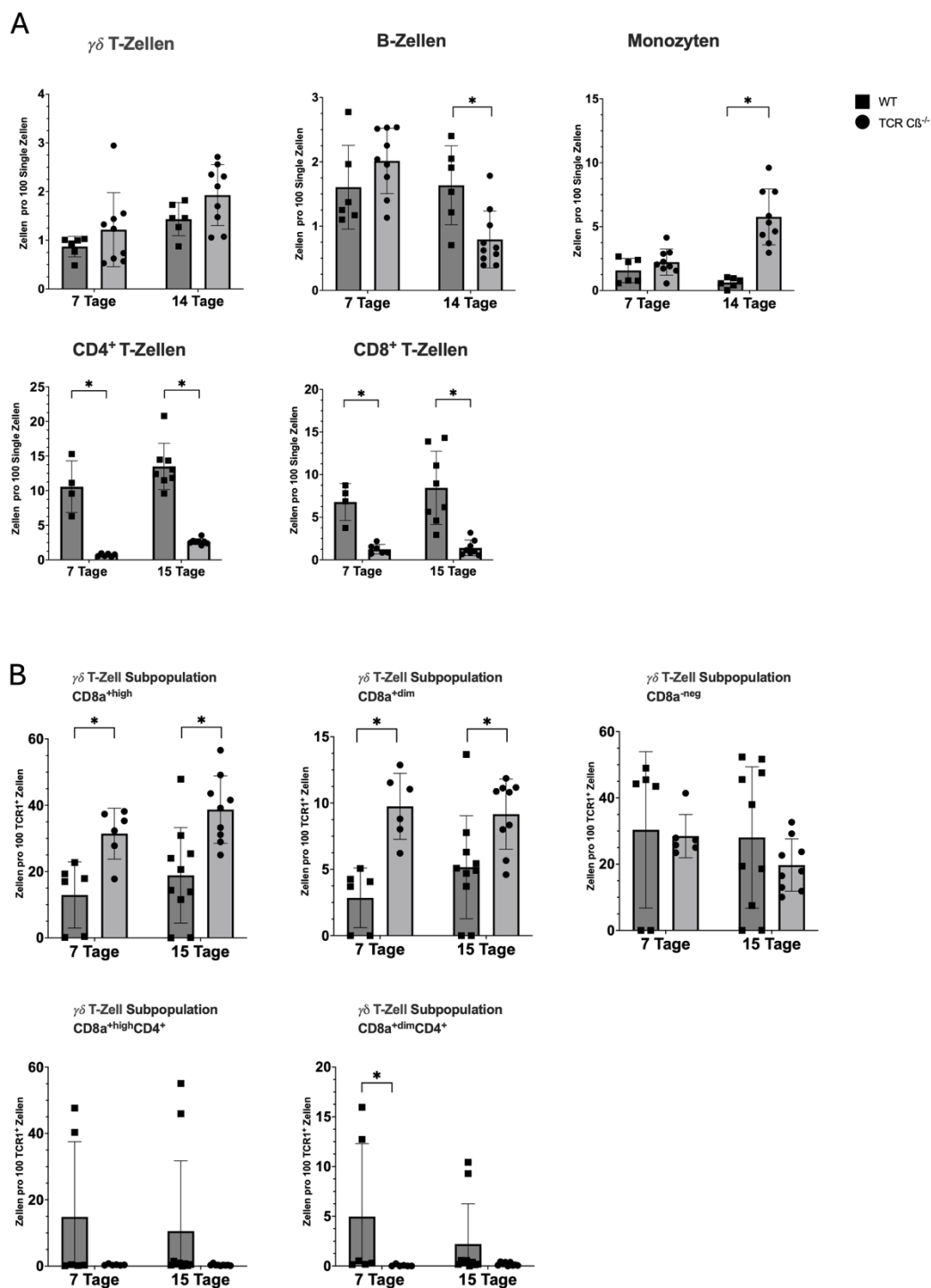


Abbildung 34: Immunphänotypisierung von TCR C β ^{-/-}- und WT-Tieren (A) Durchflusszytometrische Analyse von PBMCs von TCR C β ^{-/-}- ($n \geq 6$) und WT- ($n \geq 4$) Hühnern im Alter von sieben und vierzehn/fünfzehn Tagen. $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1), B-Zellen (Bu1/AV20), Monozyten (KUL01), CD4⁺ (CT-4) und CD8⁺ (CT-8) Zellen wurden gefärbt. (B) CD8⁺ (CT-8) Zellen innerhalb der $\gamma\delta$ T-Zell-Untergruppe (TCR1) wurden auf der Grundlage ihrer CD8-Expression und der Koexpression von CD4 (CT-4) von TCR C β ^{-/-}- ($n \geq 6$) und WT- ($n \geq 4$) Hühnern im Alter von sieben und fünfzehn Tagen analysiert. ($n \geq 4$, * $p < 0.05$, t-Test). Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der lymphatischen Organe wurden in der Milz von vierzehn Tage alten TCR C β KO-Tieren signifikant mehr $\gamma\delta$ T-Zellen ($p=0,000005$) und B-Zellen ($p=0,000076$) in den TCR C β KO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren (siehe

Abbildung 35A) gemessen. Es wurden keine Unterschiede ($p=0,407698$) bei den Makrophagen in der Milz festgestellt. Die $CD8^+$ Isotypen $CD8\alpha\alpha$ ($p=0,031331$) und $CD8\alpha\beta$ ($p=0,002557$) unterscheiden sich signifikant innerhalb der $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen den Schlupfgeschwistern (Abbildung 35A+B). Im Thymus sind signifikant mehr $\gamma\delta$ T-Zellen ($p<0,0001$) zu sehen. In der Bursa konnten keine Unterschiede an B-Zellen und Makrophagen festgestellt werden (siehe Abbildung 35C+D).

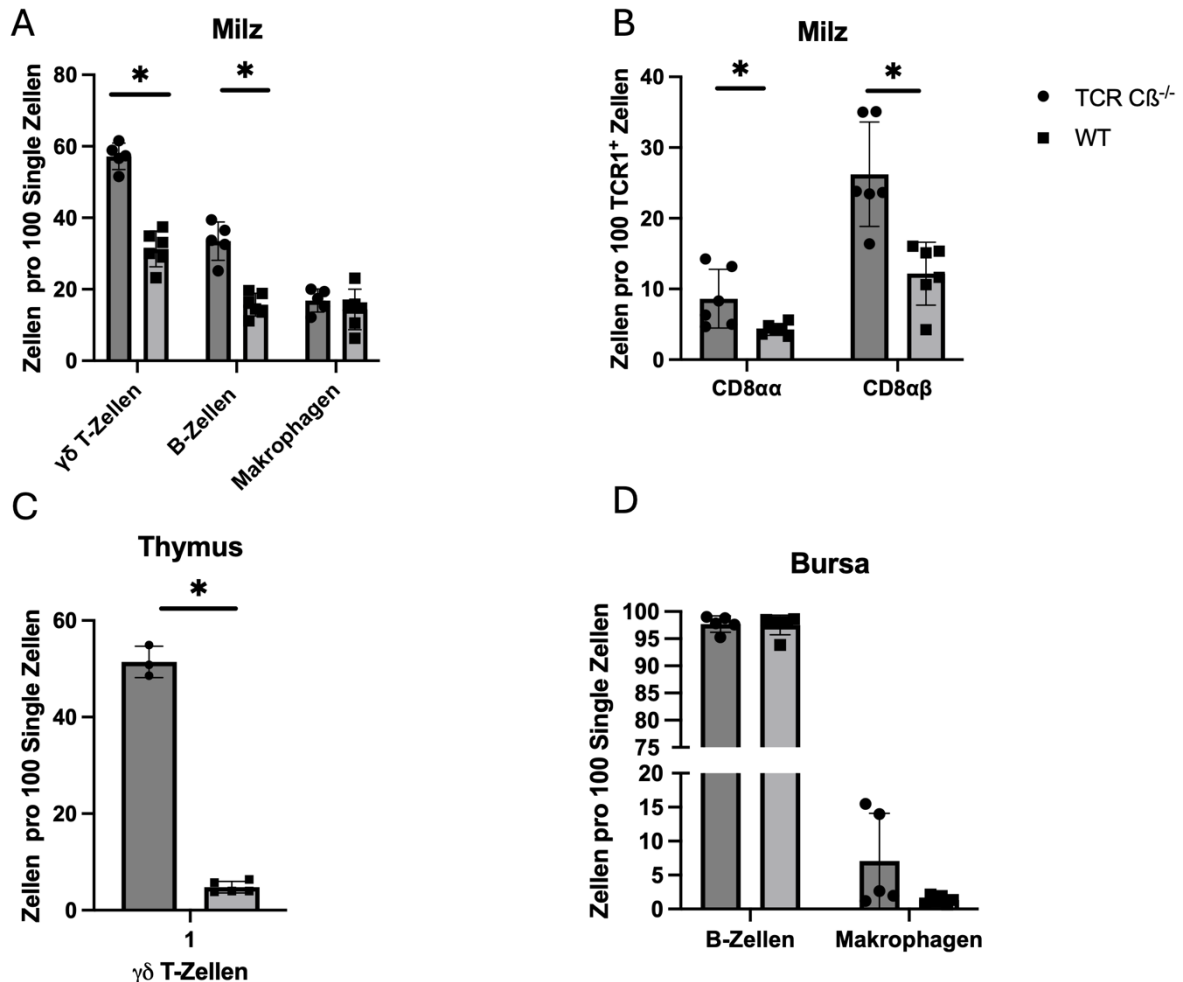


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der lymphatischen Organe von TCR Cβ^{-/-}-Tieren ($n\geq 3$) im Vergleich zu WT-Hühnern ($n\geq 5$) vierzehn Tage nach dem Schlupf. A) $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1), B-Zellen (Bu1/AV20) und Makrophagen (KUL01) in der Milz. B) $CD8^+$ (Klone CT-8, EP42) Isotypen innerhalb der $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1) in der Milz. C) $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1) im Thymus. D) B-Zellen (Bu1) und Makrophagen (KUL01) in der Bursa. ($n\geq 3$, * $p < 0,05$, Multiple t-Test)

6.1.5 Der Phänotyp der TCR Cβ KO-Hühner beeinflusst die Entwicklung der lymphatischen Organe

Bei der histologischen Untersuchung der TCR Cβ KO-Hühnern wurde vierzehn Tage nach dem Schlupf der Thymus, die Milz und die Bursa untersucht. Im Vergleich zu den Wildtyp-Hühnern ist der Thymus der TCR Cβ KO-Tiere nicht in Kortex und Medulla gegliedert und

deutlich verkleinert. Die Milz der TCR C β KO-Hühner zeigt Entzündungsherde, die, wie hier abgebildet wurde, durch nekrotische Zellen erkennbar sind. Die Bursafollikel der TCR C β KO-Hühner waren vierzehn Tage nach dem Schlupf kleiner als die Follikel der Wildtyp-Tiere (siehe Abbildung 36A). Die Granulome an Schnabel, Ständern und Kamm wurden ebenfalls präpariert und immunhistologisch gefärbt. Hierbei wurden B-Zellen und Granulozyten innerhalb der Granulome gefunden. Die Granulome waren umrandet von $\gamma\delta$ T-Zellen. Das umherliegende Gewebe war durchdrungen von Makrophagen (siehe Abbildung 36B). In Wildtyp-Hühner war keine Granulombildung auf der Haut vorhanden.

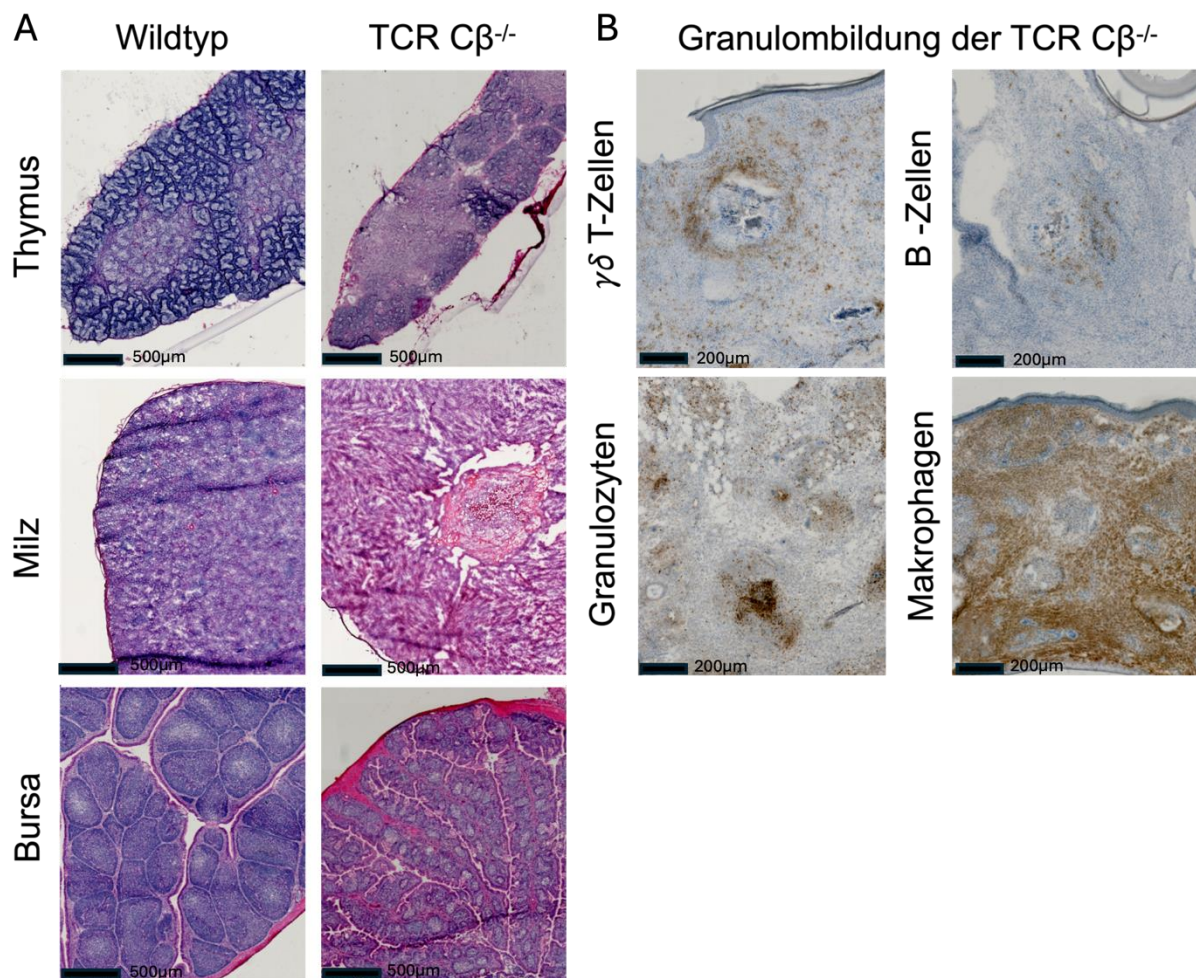


Abbildung 36: Histologische Analyse von TCR C β ^{-/-}-Hühnern. (A) Schnitte von Thymus, Milz, Bursa von vierzehn Tage alten WT- und TCR C β KO-Hühnern wurden präpariert und mit H&E gefärbt. (B) Hautgranulome von vierzehn Tage alten TCR C β KO- Hühnern wurden seziiert und auf $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1), B-Zellen (BU1/AV20), Granulozyten (GRL1) und Makrophagen (Kul01) angefärbt. Es wird jeweils ein repräsentatives Bild von mindestens drei verschiedenen Tieren pro Genotyp gezeigt. Maßstabsbalken von (A) Thymus, Milz, Bursa = 500 μ m; von (B) = 200 μ m. Adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

Die Fluoreszenzfärbung der Milz zeigte eine Veränderung in der Struktur in den TCR C β KO-Tieren. In Wildtyp-Hühnern wurden germinalen Zentren bestehend aus B-Zellen detektiert, welche von CD4⁺ T-Zellen umrandet wurden (siehe Abbildung 37A). Außerdem

bildeten sich periellipsoide Lymphozytenscheiden (PALS) bestehend aus B-Zellen und umgeben von CD8⁺ T-Zellen in Wildtyp-Tieren. Keines dieser Strukturmerkmale war in der Milz der TCR C β KO-Tiere auffindbar (siehe Abbildung 37B).

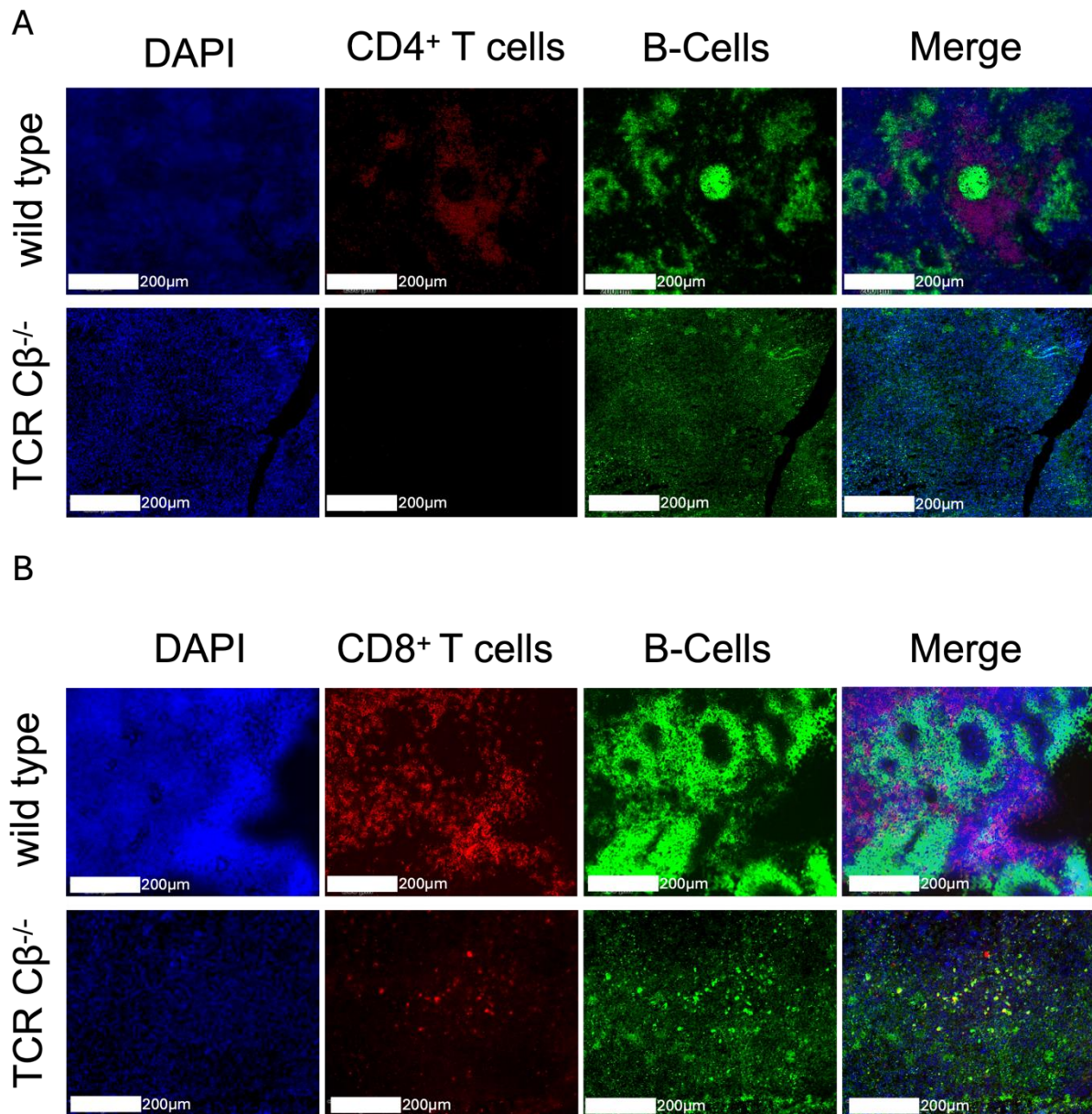


Abbildung 37: Schnitte aus der Milz von vierzehn Tage alten Wildtyp- und TCR C β KO-Hühnern wurden präpariert und mit (A) Maus-Anti-Huhn-CD4-AF568 (Klon CT4) (rot) oder (B) Anti-Huhn-CD8-AF568 (Klon CT8) (rot) und Anti-Huhn-Bu1-FITC (Klon AV20) (grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Abgebildet ist ein repräsentatives Bild von mindestens drei verschiedenen Tieren pro Genotyp (Maßstab = 200 μ m). Abbildung adaptiert von Heyl et al.(2023) [91].

Auch der Muskelmagen der TCR C β KO-Tiere erschien verdickt mit nekrotischen Zellen. Die H&E-Färbung des Proventrikulus zeigt eine deutliche Verdickung der Tunica Muskularis und der Tunica Mukosa, sodass die Drüsen im Magen verkleinert sind (siehe Abbildung 38).

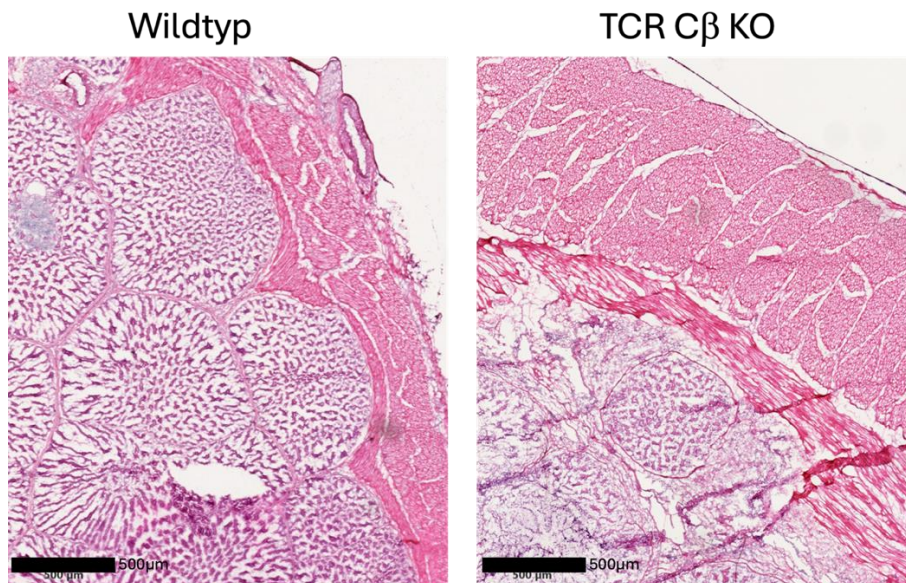


Abbildung 38: Histologische Analyse des Proventrikulus von TCR C β KO-Hühnern im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Schnitte von vierzehn Tage alten WT- und TCR C β KO-Hühnern wurden präpariert und mit H&E gefärbt. Es wird jeweils ein repräsentatives Bild von mindestens drei verschiedenen Tieren pro Genotyp gezeigt. Maßstabsbalken = 500 μ m. Adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

6.1.6 Der Knockout von $\alpha\beta$ T-Zellen führt zu niedrigen Serum Antikörper Leveln

Die Messung der totalen Serumimmunglobulinkonzentration von IgM, IgY und IgA ergab vierzehn Tage nach dem Schlupf im linearen Teil der Kurve niedrigere Serum Antikörper Level in den TCR C β KO-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Hühnern. Bei einer Verdünnung von 1:900 lag der OD-Wert der TCR C β KO-Tiere für IgM bei 0,795(\pm 0,31), während der OD-Wert der Wildtyp-Tiere bei 1,27(\pm 0,22) lag. Für IgA wurde ein OD-Wert von 0,532(\pm 0,137) in den TCR C β KO-Tieren gemessen im Vergleich zu einem OD-Wert von 0,995(\pm 0,115) in den Wildtyp-Hühnern bei einer Verdünnung von 1:90. Die OD-Werte für IgY bei einer Verdünnung von 1:900 lagen bei den TCR C β KO-Tieren bei 0,952(\pm 0,413), während die Wildtyp-Hühner OD-Werte einen Mittelwert von 1,661(\pm 0,456) ergaben (siehe Abbildung 39).

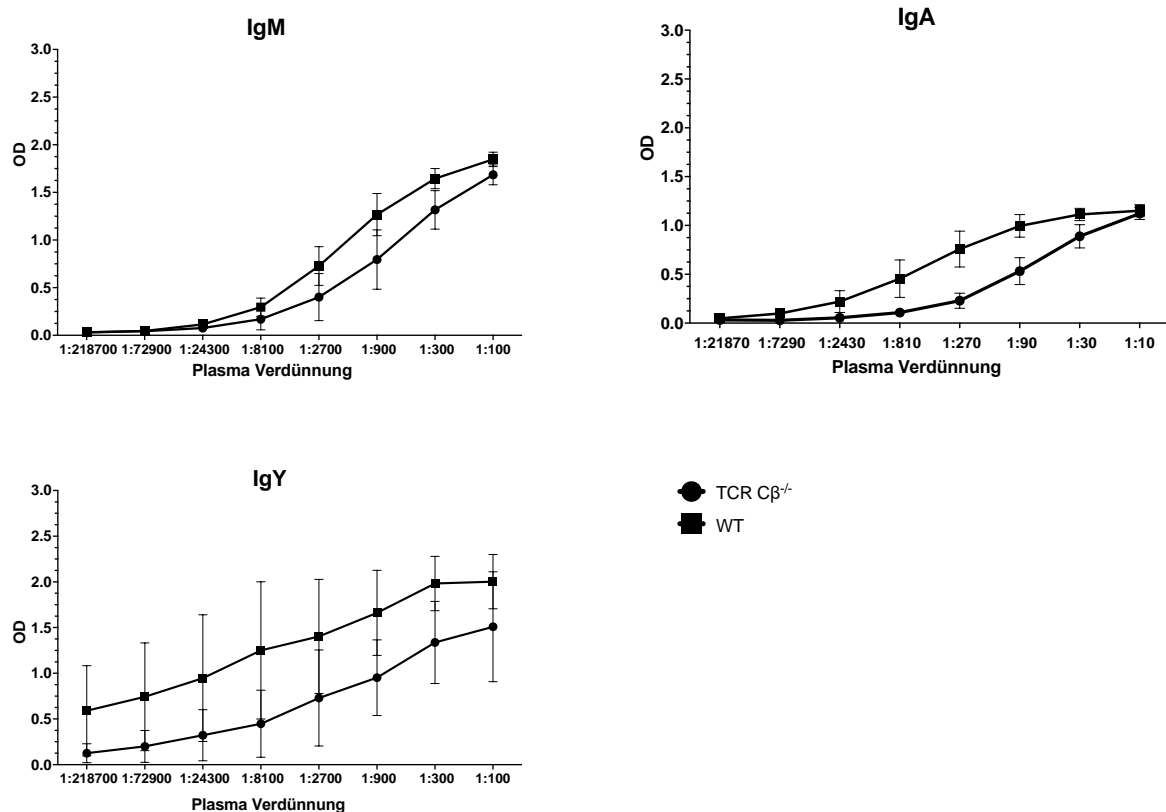


Abbildung 39: Blutplasma von IgM (1:100; log3), IgY(1:100; log3) und IgA (1:10; log3) von TCR C β ^{-/-} (n = 10) und WT-Hühnern (n = 12) im Alter von vierzehn Tagen wurde mittels Sandwich-ELISA (mouse anti-chicken IgM/Y/A; anti-chicken IgM/Y/A-HRP) gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert und die SD des OD_{620nm}-OD_{450nm}. Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91]

6.1.7 FoxP3-Genexpression ist signifikant niedriger in TCR C β KO-Tieren

Bei Betrachtung der proinflammatorischen Gene der TCR C β KO- und TCR C γ KO-Hühnern im Vergleich zu Wildtyp-Hühnern, ergab sich ein 4,779 (\pm 2,917) -fach signifikant höherer Fold Change für IL-6 im Thymus von zwei Wochen alten TCR C β KO-Tieren ($p=0,0181$). Ebenfalls war die Expression von IL-1 β in den PBMCs der TCR C β KO-Tiere 3,565 (\pm 2,661) -fach signifikant erhöht im Gegensatz zu den Schlupfgeschwistern ($p=0,0368$). Bei IL-22 ergab sich ein 0,413 (\pm 0,876) -fach signifikant niedriger Fold Change in der Milz von TCR C β KO-Tieren ($p<0,0001$) und ein um 1,63 (\pm 0,910) Fold signifikant höherer Wert in TCR C γ KO-Tiere ($p=0,0024$) (siehe Abbildung 40).

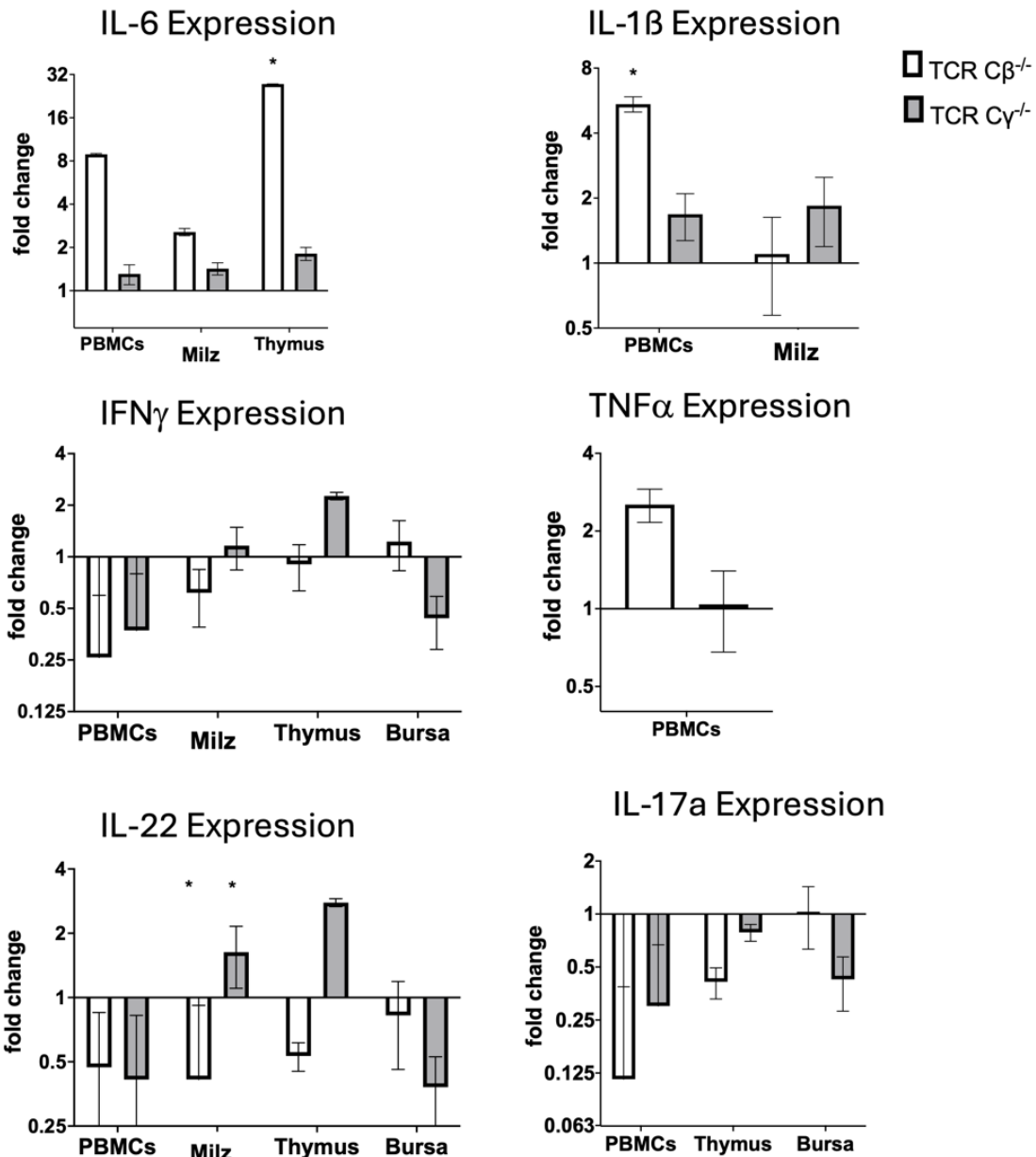


Abbildung 40: Pro-inflammatorische Genexpressionen von TCR C β KO- und TCR C γ KO-Tieren im Vergleich zu WT-Hühnern. Die Expressionsniveaus von den Zytokinen IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF α , IL-22, IL-17a wurden im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren analysiert (normalisiert = 1). Die RNA-Integrität wurde gemessen, und nur RNA mit einem RIN \geq 7,5 wurde für die Analyse verwendet. qRT-PCR wurde in Duplikaten durchgeführt. n \geq 3 Tiere pro Genotyp wurden verwendet. Angegeben wurden Mittelwert und Standardabweichung. (n \geq 3, * p<0,05, one-way ANOVA). Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91].

Bei den antiinflammatorischen Genen war IL-5 um 0,116(\pm 0,602) Fold (p=0,021) und TGF β um 0,235(\pm 0,710) Fold (p=0,0012) signifikant niedriger in der Milz von TCR C β KO-Hühnern im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (siehe Abbildung 41).

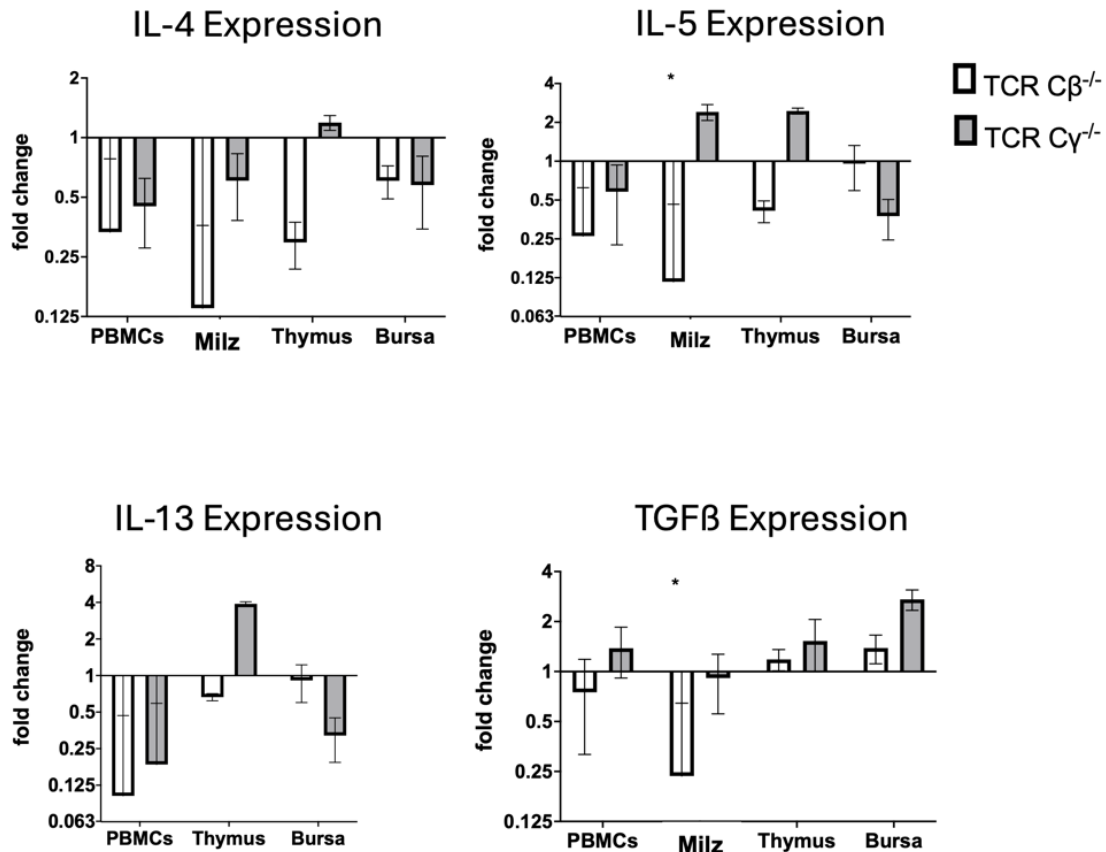


Abbildung 41: Antiinflammatorische Genexpressionsanalyse von TCR C β KO- und TCR C γ KO-Tieren im Vergleich zu WT-Hühnern. Die Expressionsniveaus von den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-13, TGF β wurden im Vergleich zu Wildtyp-Tieren analysiert (normalisiert = 1). Die RNA-Integrität wurde gemessen, und nur RNA mit einem RIN \geq 7,5 wurde für die Analyse verwendet. qRT-PCR wurde in Duplikaten durchgeführt. n \geq 3 Tiere pro Genotyp wurden verwendet. Angegeben wurden Mittelwert und Standardabweichung. (n \geq 3, * p<0,05, one-way ANOVA). Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91]

Die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 war 0,0319(\pm 0,516) Fold in PBMCs (p=0,0001), 0,0139(\pm 0,635) Fold in der Milz (p<0,0001) und 0,0897(\pm 0,366) Fold im Thymus (p=0,0049) in TCR C β KO-Hühnern signifikant niedriger als in WT-Hühnern (siehe Abbildung 42).

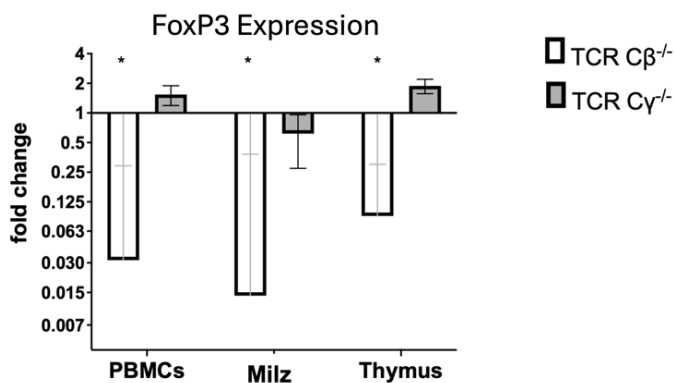


Abbildung 42: FoxP3-Expression von TCR C β KO- und TCR C γ KO-Tieren im Vergleich zu WT-Hühnern (normalisiert = 1). Die RNA-Integrität wurde gemessen, und nur RNA mit einem RIN \geq 7,5 wurde für die Analyse verwendet. qRT-PCR wurde in Duplikaten durchgeführt. n \geq 3 Tiere pro Genotyp wurden verwendet. Mittelwert und Standardabweichung sind angegeben (n \geq 3, * p<0,05, one-way ANOVA). Abbildung adaptiert von Heyl et al. (2023) [91]

6.1.8 Frühe T-Zell-Aktivierungsmarkern der $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant niedriger in TCR C β KO-Tieren

Um Herauszufinden, ob die verbleibenden T-Zellen in den TCR C β KO-Tieren anders reagieren, wurden T-Zellen von sieben Tage alten TCR C β KO-Tieren mit ConA stimuliert und die Aktivierungsmarker über vier Tage mittels FACS-Analyse gemessen. Es wurden signifikant niedrigere Expressionslevel für den frühen Aktivierungsmarkern CD25 gefunden (Tag 1 $p=0,000796$ und Tag 2 $p=0,002409$) (siehe Abbildung 43A). Ebenso war der frühe Aktivierungsmarker MHCII signifikant niedriger (Tag 1 $p=0,003508$ und Tag 2 $p=0,021496$) (siehe Abbildung 43B). Bei den späten Aktivierungsmarker CD28 und dem Gedächtnis T-Zellmarker CD57 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen TCR C β KO-Hühnern und Wildtyp-Hühnern gefunden (siehe Abbildung 43 C+D).

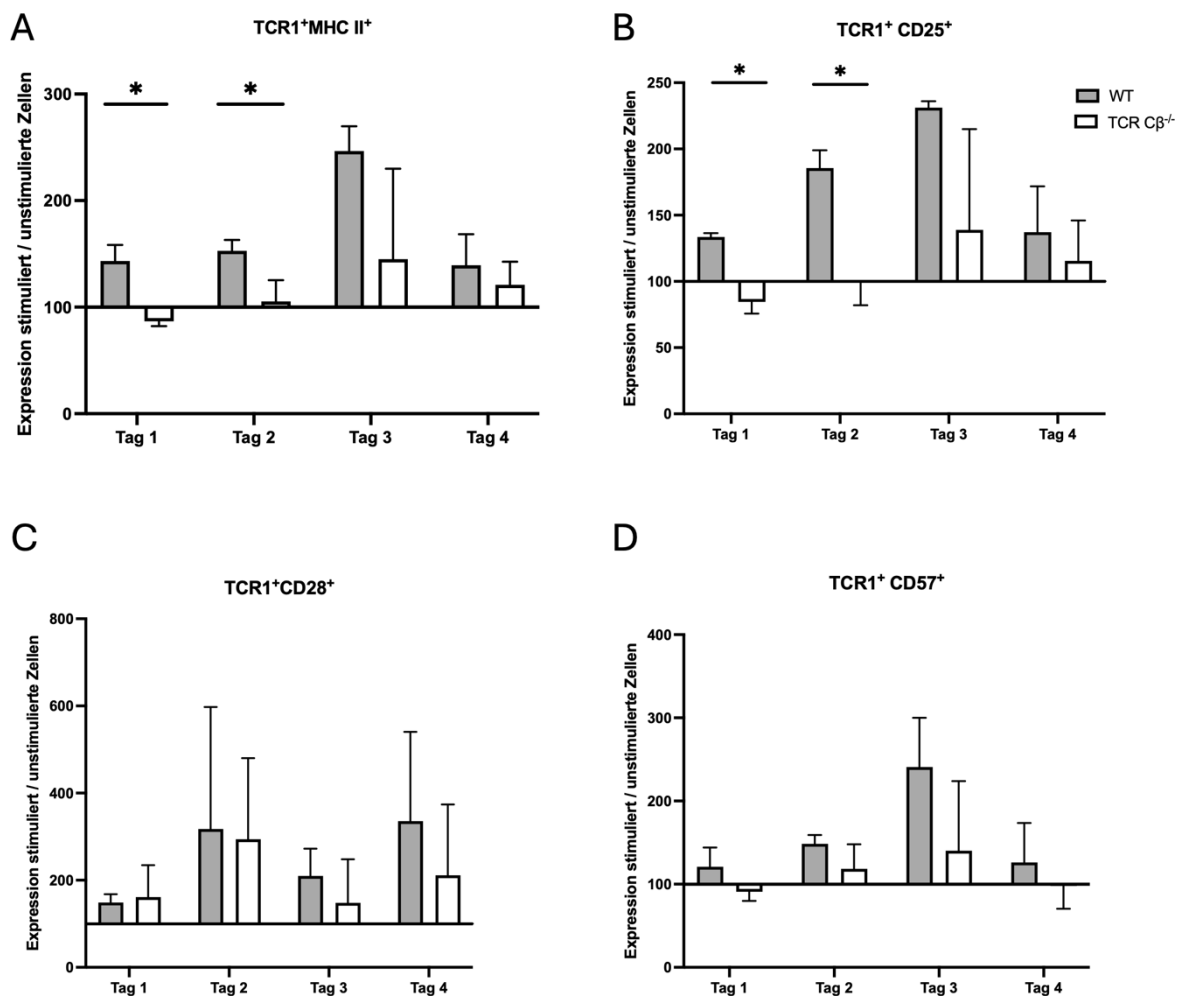


Abbildung 43: Messung der T-Zellaktivierungsmarker von A) MHCII (Klon 2G11), B) CD25 (Klon AbD13504) C) CD28 Klon (AV7) und D) CD57 (Klon NK-1) innerhalb der TCR1⁺ Subpopulation von TCR C β KO- ($n=3$) im Vergleich zu WT-Hühnern ($n=3$) sieben Tage nach dem Schlupf. Zellen wurden für vier Tage kultiviert und mit ConA stimuliert, und jeden Tag wurde ein Teil der Zellen entnommen und für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die Expression der stimulierten Zellen wurde im Verhältnis zu unstimulierten Zellen berechnet ($n=3$, * $p<0,05$, t-Test).

Die Messung der Enzyme Perforin und Granzym B, die von T-Zellen zur zytotoxischen Erregerabwehr gebildet werden, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und TCR C β KO-Hühnern. Allerdings waren die Perforin-Werte nach fünfzehn Tagen bei der TCR C β KO-Hühner im Mittel mit 0,876(\pm 1,722) Zellen pro 100 CD3 $^{+}$ -Zellen höher als 0,151 (\pm 0,289) Zellen pro 100 CD3 $^{+}$ -Zellen in den Wildtyp-Kontrolltieren (Abbildung 44 A). Nach sieben Tagen zeigten die TCR C β KO-Tiere mit 0,242(\pm 0,036) Zellen pro 100 CD3 $^{+}$ -Zellen leicht erhöhte Granzym B-Werte im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern mit 0,157(\pm 0,045) Zellen pro 100 CD3 $^{+}$ -Zellen (siehe Abbildung 44 B).

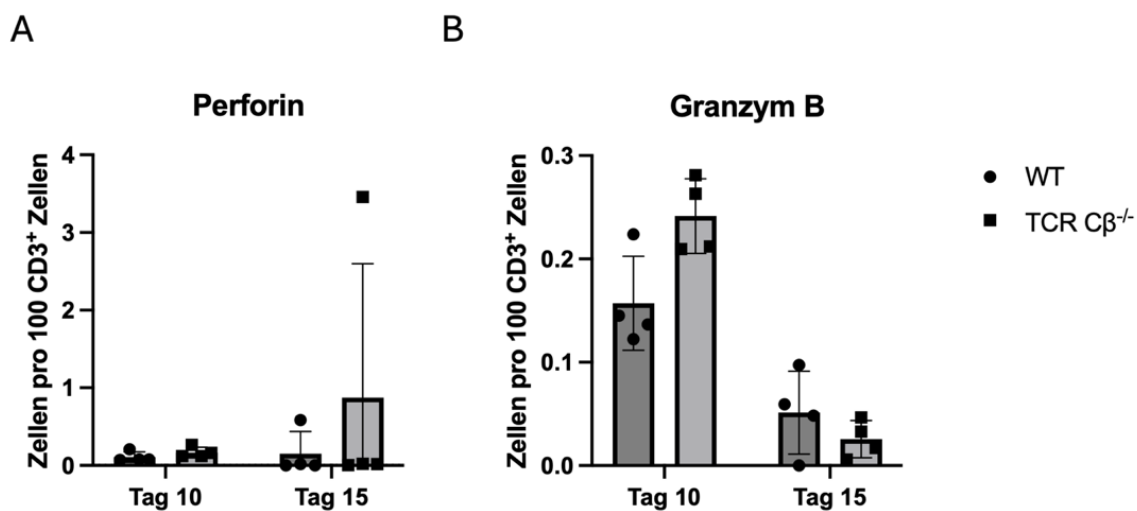


Abbildung 44: Durchflusszytometrische Messung von A) Perforin-FITC (F-1) und B) Granzym B-PE (3G8.5) innerhalb CD3 $^{+}$ -PacBlue (CT3) von TCR C β KO-Tiere (n=4) im Vergleich zu Wildtyp-Hühnern (n=5) an Tag zehn und Tag fünfzehn nach dem Schlupf. (n \geq 4, *p<0,05, t-Test)

6.1.9 Ausschluss bakterieller Infektionen als Stimulus für den Phänotyp der TCR C β KO-Tiere

Mithilfe einer Biospiestanze wurde ein Stück der Milz von vierzehn Tage alten TCR C β KO-Hühnern entnommen. Die Proben wurden in Nährmedium kultiviert, um eine bakterielle Infektion auszuschließen. Die Milz wurde hierfür auf einer Tryptone-Soya-Agarplatte ausgestrichen und für 48h inkubiert. Es wurde kein bakterielles Wachstum in der Milz festgestellt, da nach der Inkubationszeit keine Bakterienkolonien zu sehen waren.

6.1.10 Generierung von TCR-Doppel-KO-Hühnern

Um zu überprüfen, ob die $\gamma\delta$ T-Zellen verantwortlich für den starken Phänotyp der TCR C β KO-Hühner sind, wurden beide T-Zell-Knockout-Linien, TCR C β KO und TCR C γ KO,

miteinander verpaart. Hierbei wurde in der F1-Generation gestartet, sodass zunächst Heterozygote $TCR C\beta^{+/-} C\gamma^{+/-}$ -Tiere generiert wurden. In der nächsten Generation wurden daraufhin in einem Verhältnis 1:16 Tiere generiert, die weder $\alpha\beta$ T-Zellen noch $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen (siehe Abbildung 45).

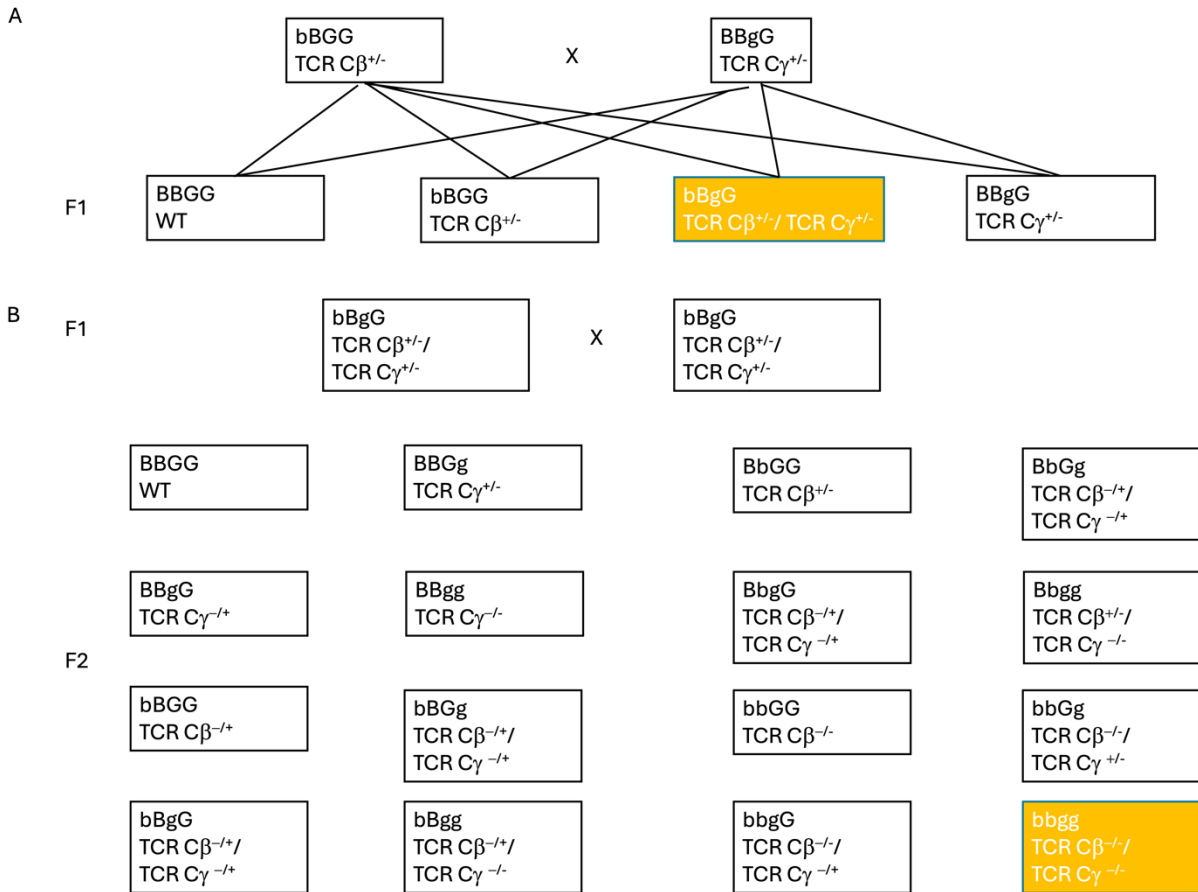


Abbildung 45: Anpaarungsstrategie für einen TCR-Doppel-KO von $TCR C\beta^{+/-}$ - und $TCR C\gamma^{+/-}$ -Tieren. A) Bei der Kreuzung heterozygoter $TCR C\beta^{+/-}$ - und $TCR C\gamma^{+/-}$ -Hühner bekommt man bei einem aus vier Nachkommen die Kombination aus beiden T-Zell KO auf je einem Allel. B) Kreuzt man diese F1-Generation miteinander, entstehen neue Genotypen mit unterschiedlichen Kombinationen der Allele. Ein Tier aus 16 Nachkommen hat dabei den Genotyp $TCR C\beta^{-/-} C\gamma^{-/-}$. Großbuchstaben kodieren WT-Allele, Kleinbuchstaben bedeuten ein genetisch modifiziertes Allel. Der Erbgang mit zwei Merkmalen folgt Mendels Unabhängigkeitsregel.

Die Doppel-KO-Tiere zeigten denselben Phänotyp wie die $TCR C\beta$ KO-Tiere. Sie zeigten ebenfalls Entzündungen der Milz und des Muskelmagens, erkennbar durch Nekrosen im Gewebe (siehe Abbildung 46 B+D). Außerdem waren die Bursafollikel verkleinert (siehe Abbildung 46 C). Der Thymus zeigte ebenfalls Entzündungsherde mit nekrotischen Zellen und war verkleinert (siehe Abbildung 46 A).

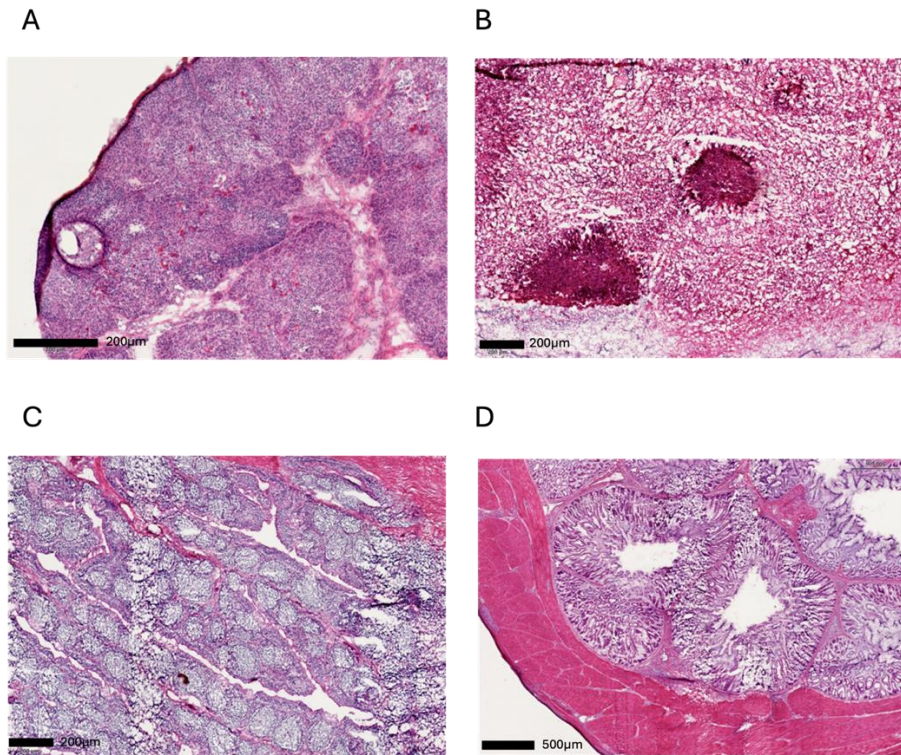


Abbildung 46: Histologische Analyse des A) Thymus, B) Milz, C) Bursa und D) Muskelmagens des TCR C β +C γ KO-Huhns (n=1). Schnitte von vierzehn Tage altem Doppel- KO-Huhn wurden präpariert und mit H&E gefärbt. Es wird jeweils ein repräsentatives Bild pro Organ gezeigt. Maßstabsbalken von Thymus, Milz und Bursa = 200 μ m; von Muskelmagen = 500 μ m

Nach zehn Tagen hatten die TCR C β + γ KO-Hühner mit 46,480g(\pm 2,445g) ein geringeres Gewicht im Vergleich zu den WT- mit 64,348g(\pm 8,449g) und TCR C γ KO-Tieren mit 67,625g(\pm 7,117g) (siehe Abbildung 47).

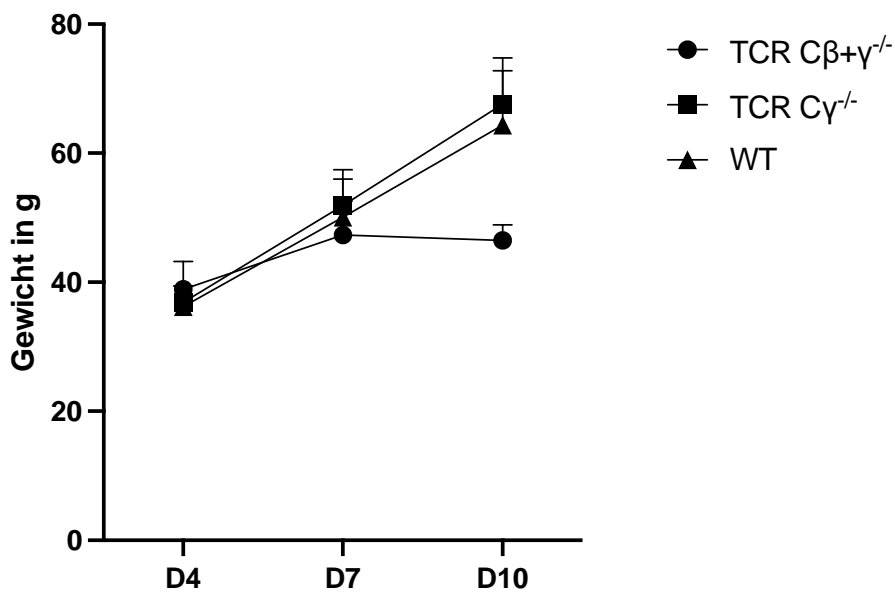


Abbildung 47: Gewichtskurve von TCR C β + γ KO-Hühner (n=3) im Vergleich zu TCR C γ KO- (n=7) und WT-Hühner (n=5). Das Gewicht der Tiere wurde an Tag 4, 7 und 10 nach Schlupf gemessen. (n \geq 3, *p<0,05, one-way ANOVA)

Die durchflusszytometrische Analyse der TCR C β + γ KO-Tiere zeigt, dass der Doppel-KO weder eine Population an $\gamma\delta$ T-Zellen noch eine Population an $\alpha\beta$ T-Zellen besitzt. Genauso wie die TCR C β KO-Tiere (siehe Ergebnis 6.1.4) haben die Doppel-KO-Tiere mit 0,18% weniger B-Zellen im Vergleich zu 3,89% im TCR C γ KO- und zu 3,68% im Wildtyp-Tier. Das analysierte Doppel-KO-Tier hat mit 2,44% mehr Monozyten als das TCR C γ KO-Huhn mit 0,81% und das WT-Tier mit 0,60% (siehe Abbildung 48).

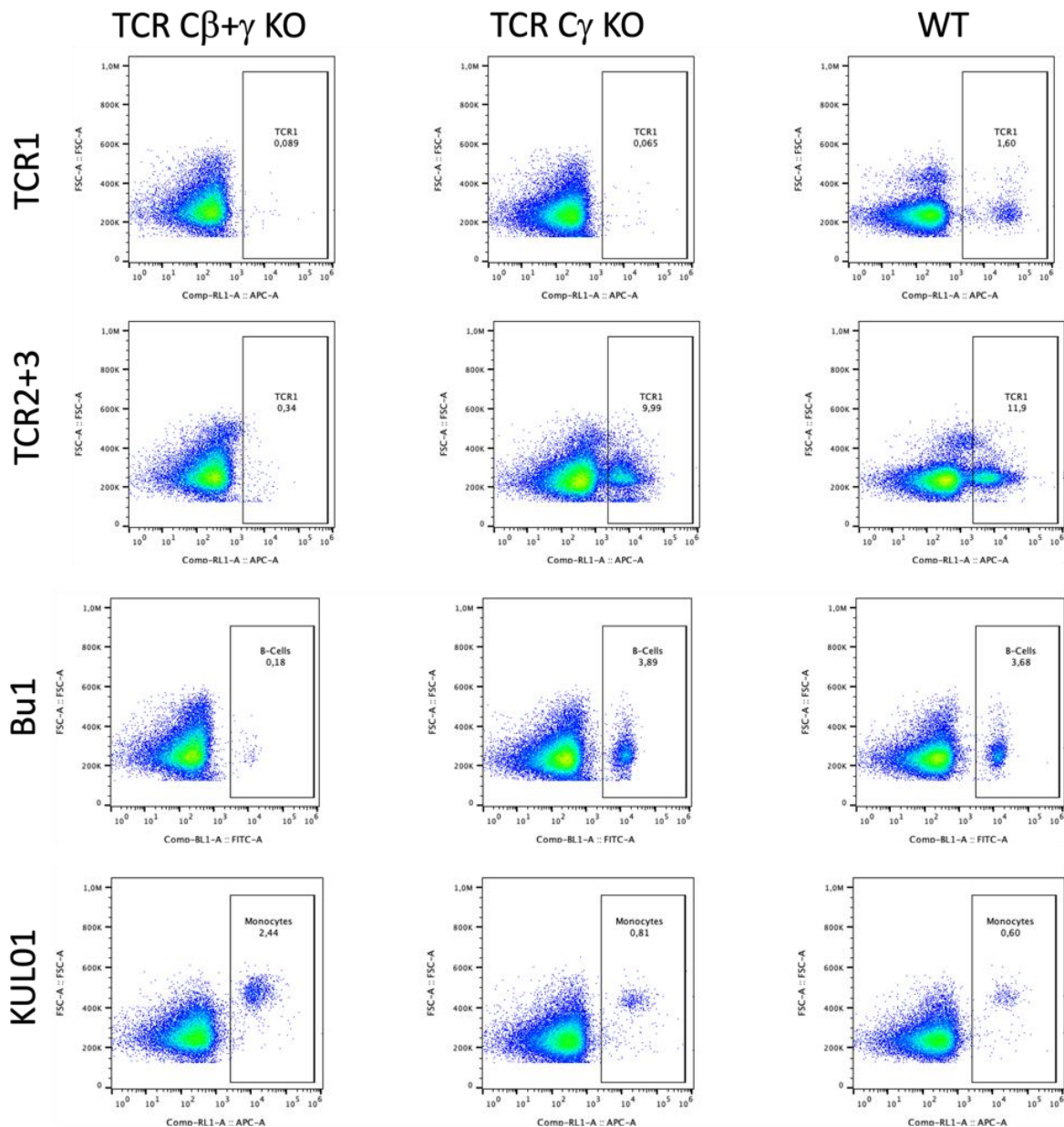


Abbildung 48: Immunophänotypisierung des TCR C β + γ KO-Huhns im Vergleich zu TCR C γ KO- und Wildtyp-Hühnern. Ein repräsentativer durchflusszytometrischer Dotplot von WT-(Tag 14; n=2), TCR C γ KO-(Tag 14; n=1) und TCR C β + γ KO-Hühnern (Tag 14; n=1) ist gezeigt. PBMCs wurden für mit dem $\gamma\delta$ -T-Zell-Marker (TCR1) und $\alpha\beta$ -T-Zellen (TCR2 + TCR3) gefärbt. Zusätzlich wurden B-Zellen (Bu1/AV20) und Monozyten (KUL01) gefärbt. Es konnte aufgrund fehlender Anzahl an Tieren keine statistische Analyse durchgeführt werden.

6.2 $\gamma\delta$ T-Zellen spielen keine entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen *Eimeria*-Infektionen

Um die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen während der Infektion mit *Eimeria tenella* zu ermitteln, wurde ein Primärinfektionsexperiment durchgeführt. Hierbei wurden sowohl TCR C γ KO-Tiere als auch Wildtyp-Tiere infiziert und mit den nicht-infizierten Kontrollgruppen verglichen. In einem zweiten Challenge-Experiment wurde eine Gruppe von jedem Genotypen mit einer niedrigen Dosis *Eimeria tenella* per os inokuliert, um eine einer Impfung ähnliche Immunantwort hervorzurufen. Im nächsten Schritt wurden alle Tiere mit einer hohen Dosis per os inokuliert.

Diese Infektionsexperimente wurden am INRAE, Tours Frankreich, durchgeführt. Hierfür wurden die Eier von der TUM an das INRAE transportiert. Für das Genotyping der Tiere wurden Blutproben am INRAE entnommen und an die TUM zur Analyse geschickt. Das Wiegen der Tiere, die Bestimmung des Läsionsscores, die Bestimmung der Oozytenzahl und die Durchflusszytometrie wurden gemeinsam am INRAE durchgeführt. Die Analyse dieser Rohdaten wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Caecumproben für die histologische Analyse wurden an der TUM bearbeitet.

6.2.1 Shizonten dringen signifikant weniger tief in die Submukosa von primärinfizierten TCR C γ KO-Tiere ein

Sowohl im Primärinfektionsversuch als auch im Challenge-Experiment konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im Körpergewicht festgestellt werden (siehe Abbildung 49).

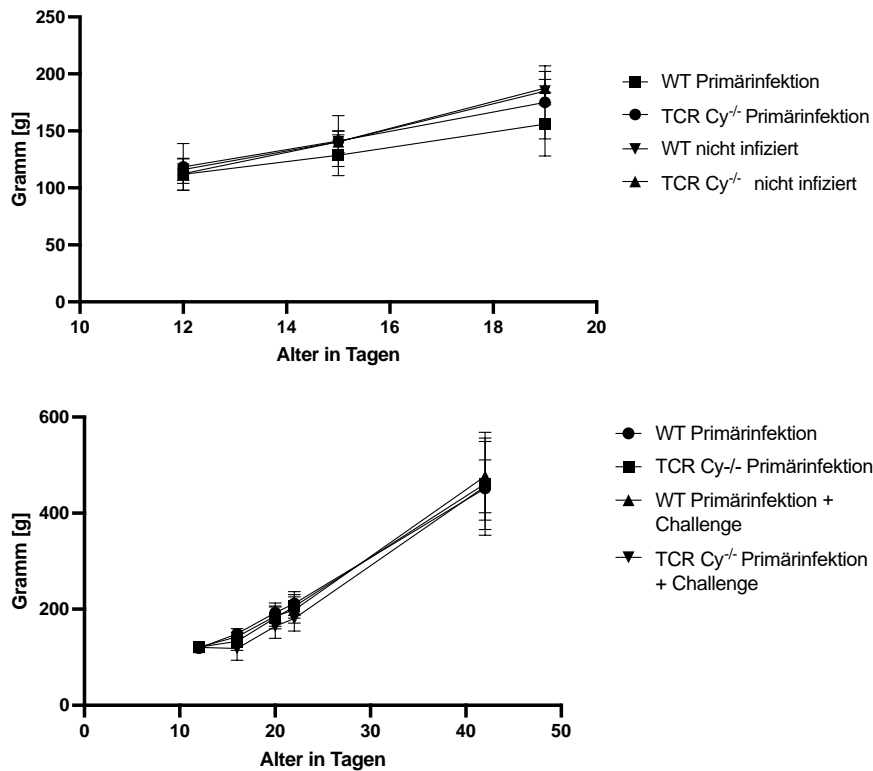


Abbildung 49: Gewichtskurven von A) Primärinfektionsversuch der TCR $C\gamma$ KO-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Das Gewicht der TCR $C\gamma$ KO- und WT-Tiere wurde an Tag 12, 15 und 19 nach dem Schlupf der Tiere bestimmt. Gewichtskurven des B) Challenge Experimentes der TCR $C\gamma$ KO-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Hühnern. Das Gewicht der TCR $C\gamma$ KO- und WT-Tiere wurde an Tag 12, 16, 20, 22 und 42 nach dem Schlupf der Tiere bestimmt.

Der Läsionsscore nach Johnson et al. (1970) [129] zwischen Wildtyp- und TCR $C\gamma$ KO-Hühnern im Primärinfektionsversuch unterscheidet sich nicht signifikant. Auch im Challenge-Experiment konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der Läsionsscore zwischen Primärinfektion und Challenge-Infektion bei den TCR $C\gamma$ KO-Tieren ($p=0,0353$) und WT-Hühnern ($p=0,0001$), sowie zwischen primärinfizierten TCR $C\gamma$ KO-Tieren und sekundären Challenge-WT-Tieren ($p=0,0012$) und den primärinfizierten WT-Hühnern und den Challenge TCR $C\gamma$ KO-Tieren ($p=0,0358$) signifikant (siehe Abbildung 50A).

Die Anzahl der Oozyten im Caecum unterscheidet sich Primärversuch nicht signifikant zwischen Wildtyp- und TCR $C\gamma$ KO-Hühnern. Auch ist im Challenge Experiment kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu sehen. Interessanterweise ist nur die Oozytenzahl der Wildtyp-Hühner im Vergleich zwischen Primärinfektion und Challenge-Experiment signifikant unterschiedlich ($p=0,0367$). Die TCR $C\gamma$ KO-Tiere unterscheiden sich in diesen Gruppen nicht signifikant ($p=0,6640$) (siehe Abbildung 50B).

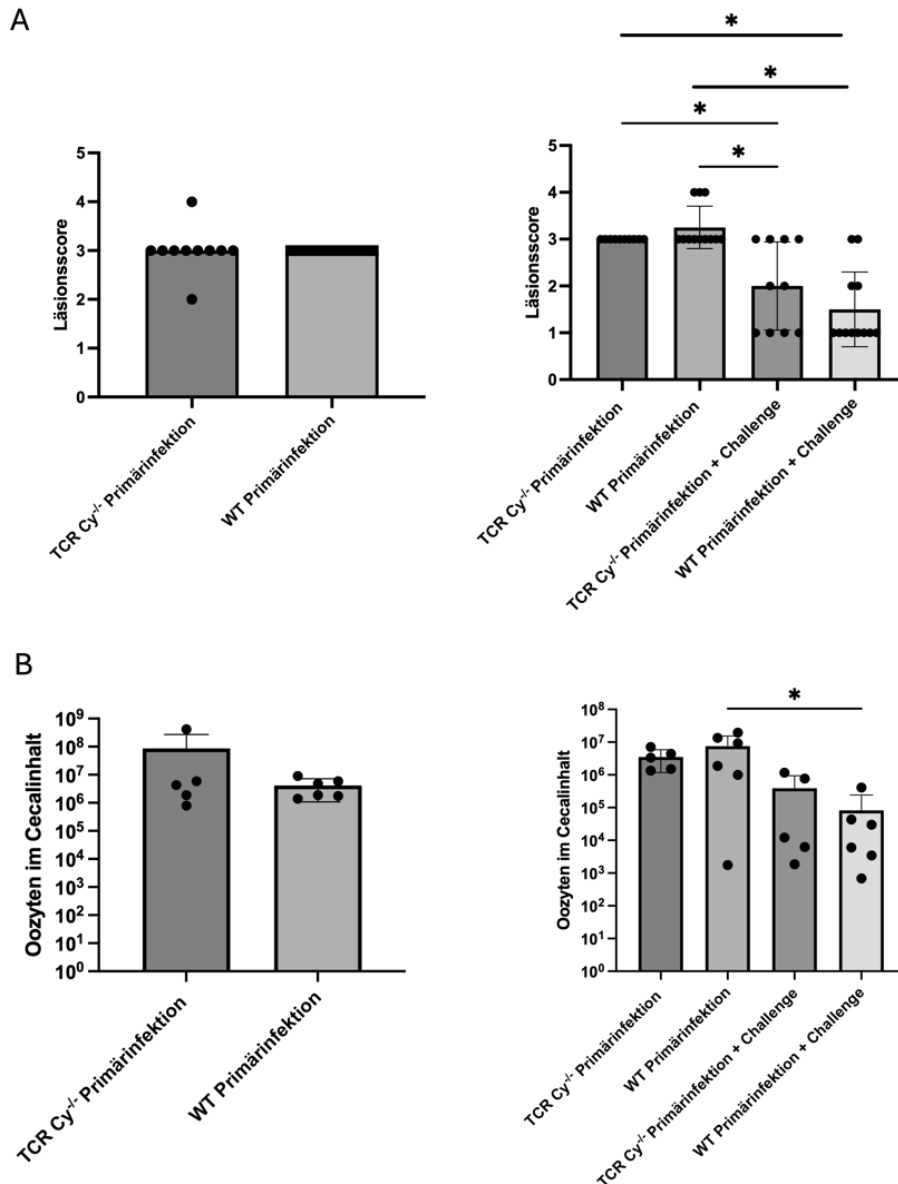


Abbildung 50: A) Läsionsscore und B) Oozyten im caecal Inhalt von Primär- und Challengeexperiment. Nach 23 Tagen im Primärinfektionsexperiment und nach 42 Tagen im Challenge-Experiment wurde Inhalt des Caecums gewogen und Oozyten gezählt. Das Caecum wurde geöffnet und der Läsionsscore von beiden Caeci unabhängig bestimmt ($n \geq 5$ * $p < 0.05$, one-way ANOVA)

Bei der Messung der maximalen Invasionstiefe der Shizonten im Challenge-Experiment, wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Primärinfizierten TCR γ KO-Tieren mit $186\mu\text{m}$ ($\pm 33,65\mu\text{m}$) und WT-Hühnern mit $219,4\mu\text{m}$ ($\pm 37,39\mu\text{m}$) Eindringtiefe gefunden. Hierbei sind die Shizonten signifikant ($p < 0,0001$) weniger tief in die Submukosa der TCR γ KO-Hühner eingedrungen als bei den WT-Tieren. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,9969$) zwischen den Schlupfgeschwistern nach der Challenge festgestellt werden (siehe Abbildung 51).

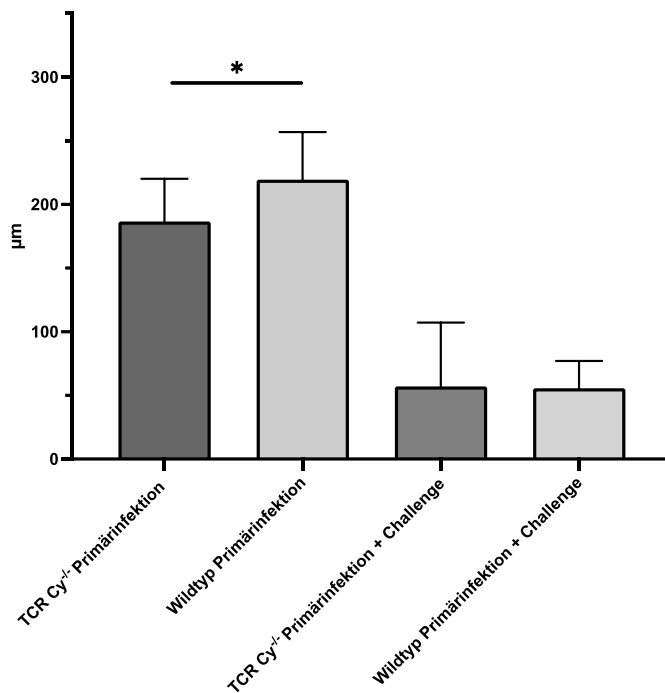


Abbildung 51: Maximale Shizonten-Invasionstiefe. 50 repräsentative Schnitte von 42 Tage alten WT- und TCR C γ KO-Hühnern wurden präpariert und H&E gefärbt. Die Eindringtiefe der Shizonten von der Mukosa Muskularis in die Submukosa wurde gemessen. Die maximale Eindringtiefe jedes Schnittes wurde gemessen ($n \geq 5$ * $p < 0.05$, one-way ANOVA)

6.2.2 TCR2⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen kompensieren den Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen

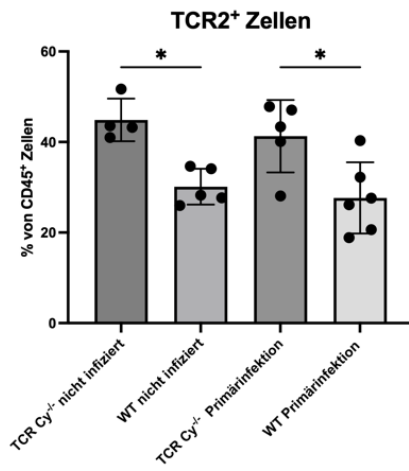
Bei der Untersuchung der Lymphozyten aus dem Caecum war sowohl im Primärinfektionsexperiment als auch im Challenge-Experiment die TCR2⁺-Lymphozyten-Population in den TCR C γ KO-Tieren höher als bei den Wildtyp-Schlupfgeschwistern. Dabei wurden im Primärinfektions-Experiment bei den nicht infizierten TCR C γ KO-Hühnern 44,88 ($\pm 4,69$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen gemessen, während in den nicht-infizierten WT-Hühnern 30,12 ($\pm 3,96$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen gemessen wurden ($p=0,0195$). In den Primärinfizierten Tieren wurden in den TCR C γ KO-Tieren 41,29 ($\pm 8,00$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen im Vergleich zu 27,64 ($\pm 7,87$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen in den Wildtyp-Tieren analysiert ($p=0,0166$). Ebenfalls signifikant ($p=0,0002$) unterscheiden sich die Primärinfizierten+Challenge TCR C γ KO-Hühner mit 33,66 ($\pm 5,39$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen, während die Wildtyp-Tiere 19,05 ($\pm 2,34$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen auswiesen (siehe Abbildung 52 A). Bei den primärinfizierten Tieren im Challenge-Experiment wurden bei den TCR C γ KO-Tieren 31,57 ($\pm 5,85$) % TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren 23,40 ($\pm 2,01$) TCR2⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen. Zwar sind auch hier mehr TCR2⁺-Zellen, allerdings unterscheiden sich die Genotypen hier nicht signifikant ($p=0,0515$) (siehe Abbildung 53A).

Die TCR3⁺-Zellen unterscheiden sich im Primärinfektionsexperiment sowohl in der nicht-infizierten Gruppe (p=0,1354), wie auch in der primärinfizierten Gruppe (p=0,1074) und im Challenge-Experiment in der primärinfizierten Gruppe (p=0,8248) sowie in der Gruppe mit Primärinfektion+Challenge-Gruppe (p=0,0675) zwischen den Genotypen nicht signifikant (siehe Abbildung 52B und Abbildung 53B).

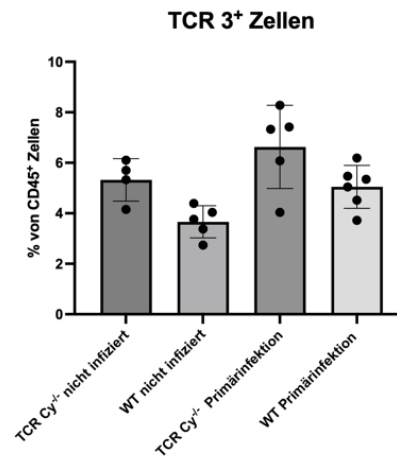
Bei Betrachtung der Makrophagen wurden im Primärinfektionsexperiment weder Unterschiede bei den nicht-infizierten (p=0,9978) noch den primärinfizierten Tieren (p=0,7053) und im Challenge-Experiment weder bei den primärinfizierten (p=0,9916) noch den primärinfizierten+Challenge- Tieren (p=0,9705) zwischen den TCR C γ KO- und den WT-Hühnern gefunden (siehe Abbildung 52C und Abbildung 53C).

Im Challenge-Experiment wurden zusätzlich B-Zellen gemessen, auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen. Genauer wurden bei den primärinfizierten TCR C γ KO-Hühnern 15,78 (\pm 4,56) % Bu1⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen gemessen und bei den WT-Geschwistern 13,15 (\pm 5,31) % Bu1⁺-Zellen in CD45⁺ Zellen. Bei den primärinfizierten + Challenge TCR C γ KO-Tieren wurden 17,06 (\pm 4,38) % Bu1⁺-Zellen in CD45⁺-Zellen gemessen, während in den WT-Hühnern 15,17 (\pm 3,78) % B-Zellen in CD45⁺-Zellen analysiert wurden (siehe Abbildung 53).

A



B



C

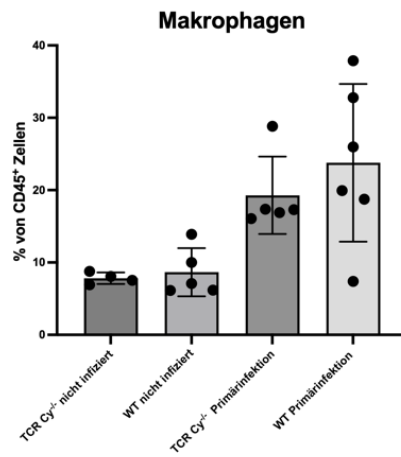


Abbildung 52: Relative Frequenz von A) $\alpha\beta$ T-Zellen (TCR2⁺), B) $\alpha\beta$ T-Zellen (TCR3⁺), C) Makrophagen (KUL01) im Primärinfektionsexperiment von TCR C β ^{-/-} (n=4) und WT-Tieren (n=5) im Alter von 23 Tagen. gemessen (n \geq 4 *p < 0.05, one-way ANOVA)

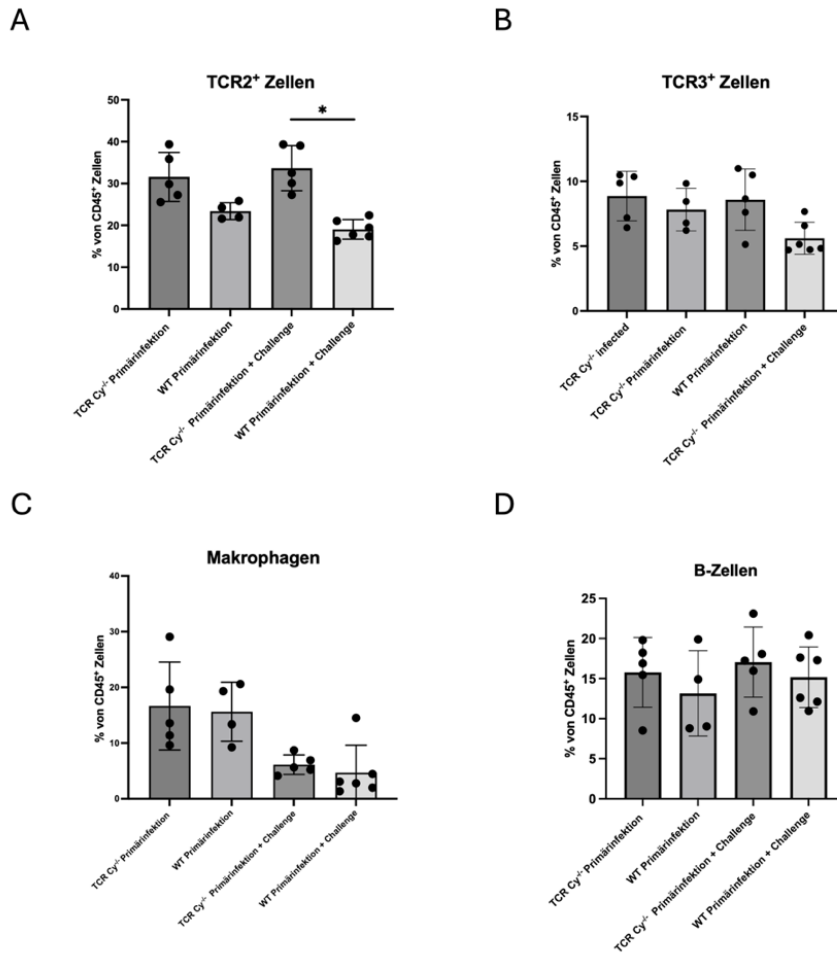


Abbildung 53: Relative Frequenz von A) $\alpha\beta$ T-Zellen (TCR2⁺), B) $\alpha\beta$ T-Zellen (TCR3⁺), C) Makrophagen (KUL01), D) B-Zellen (Bu1/AV20) im Challenge-Experiment von TCR C β ^{-/-} (n=5) und WT-Tieren (n=4) im Alter von 42 Tagen. (n \geq 4 *p < 0.05, one-way ANOVA)

Bei der Analyse der Subpopulationen CD4⁺-, CD8⁺- und Doppelnegative (DN)-Zellen der TCR2⁺-Zellen wurden im Challenge-Experiment signifikant mehr CD8⁺-Zellen (p=0,0214) in den primärinfizierten TCR C γ KO-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gefunden. Dabei wurden in den primärinfizierten TCR C γ KO- Tieren 31,26 (\pm 8,16) % CD8⁺-Zellen in TCR2⁺-Zellen im Vergleich zu 14,84 (\pm 7,11) % CD8⁺-Zellen innerhalb der TCR2⁺-Population bei den primärinfizierten Wildtyp-Geschwistern gemessen. Dieser Effekt konnte weder im Primärinfektionsexperiment noch im Challenge-Experiment gesehen werden. Ebenfalls konnten keine signifikanten Unterschiede in der TCR3⁺-Subpopulation zwischen CD4⁺-, CD8⁺- und DN- T-Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 54).

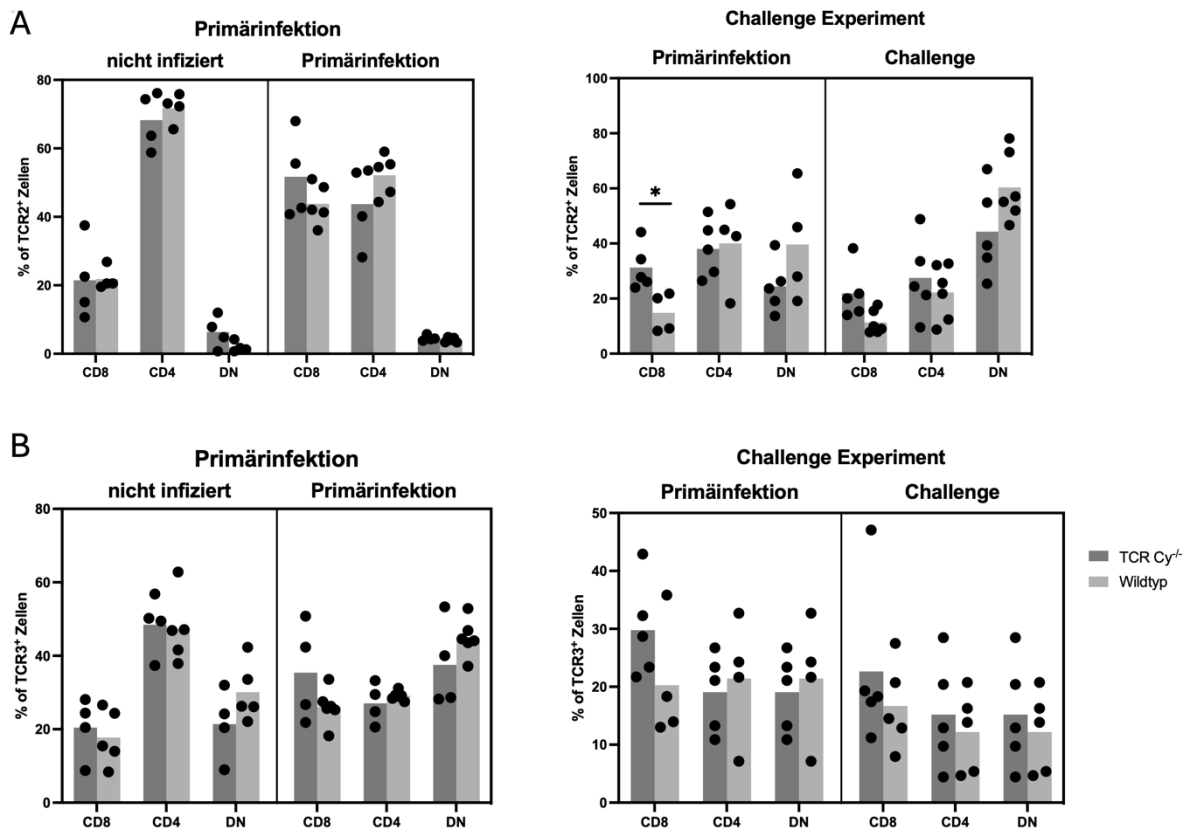


Abbildung 54: Relative Frequenz der CD4⁺-, CD8⁺-, Doppelnegativen-Subpopulationen in A) TCR2⁺-Zellen und B) TCR 3⁺ Zellen der $\alpha\beta$ T-Zellen von TCR C γ ^{-/-} (n= 4) und WT-Tieren (n= 5) im Alter von 23 Tagen im Primärinfektionsexperiment und im Alter von 42 Tagen im Challenge Experiment. (n \geq 4 *p < 0.05, one-way ANOVA)

6.2.3 TCR C γ KO-Tiere zeigen keine Unterschiede zu WT-Hühnern in den Läsionen des Caecums nach Infektion

Ein Bewertungssystem für Hämorrhagie, Kryptenatrophie, Durchbrechung der Mukosa und nekrotischen Debris wurde entwickelt, um Unterschiede zwischen Genotypen in der Primärinfektions- und den Primärinfektion+Challenge-Tieren festzustellen (siehe Methoden 5.1.7.5). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen TCR C γ KO- und Wildtyp-Hühnern festgestellt werden (siehe Abbildung 55).

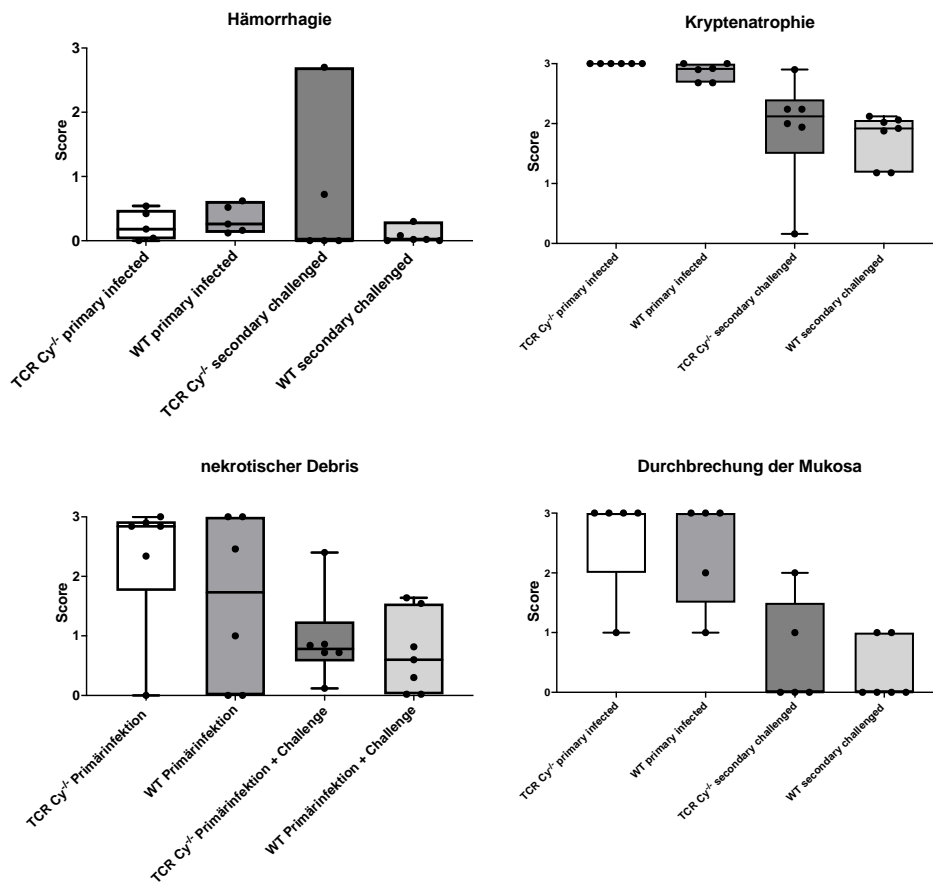


Abbildung 55: Läsionssoring zur Bewertung von A) Hämorrhagie, B) Krypten-Atrophie, C) nekrotischem Debris und D) der Durchbrechung der Mukosa. 25 repräsentative Schnitte von 42 Tage alten WT- und TCR C γ KO-Hühnern wurden präpariert und mit H&E gefärbt. Die Schnitte wurden anhand des erstellten Scoring Schemas ausgewertet. (n \geq 4 *p < 0.05, one-way ANOVA)

6.3 Erste Erfolge beim Transfer von mCherry⁺ T-Zellen in TCR KO-Hühner

Um mehr über die einzelnen Rollen der T-Zell-Subpopulationen zu erfahren, ist die Etablierung eines adoptiven Zell-Transfersystems im Huhn von großer Bedeutung. Durch die Verfügbarkeit von mCherry⁺ Spendertieren ist es möglich transferierte T-Zell-Subpopulationen, $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen, in TCR-Knockout-Hühner zu verfolgen, sodass Erkenntnisse über Funktionen, Interaktionen und Migration der Zellen untersucht werden können.

6.3.1 Vorkommen von drei MHC-Haplotypen in Spender- und Empfängertiere

Für die MHC-Haplotypisierung wurden Primer (siehe Tabelle 44) von Jim Kaufman (Arbeitskreis Immunologie, University of Edinburgh, Kollaborationspartner bei FOR5130

ImmunoChick) entworfen und etabliert. Die Analysen von Blutproben von TCR C γ KO-Empfängertieren und mCherry⁺-Spenderhühnern ergab, dass nur drei verschiedene Haplotypen vorhanden sind. B15, B21 und ein heterozygoter Mischtyp aus B15 und B21. Es wurden einzelne Primer für die Haplotypen B9, B15, B21 und B43 getestet. Zudem wurde eine Microsatelite-PCR getestet, die folgende Gruppen unterscheidet. Gruppe 1 beinhaltet die Haplotypen B2, B9 und B15, die alle eine Amplikonlänge von 250bp erzeugen. Gruppe 2 beinhaltet die Haplotypen B21 und B36, die eine Amplikonlänge von 350 bp erzeugen und Gruppe 3 beinhaltet den Haplotypen B19 mit einer Amplikonlänge von >500bp (siehe Abbildung 56). Die Ergebnisse der einzelnen Haplotypen-PCRs stimmten mit der Microsatelite-PCR überein, sodass im Folgenden nur die Microsatelite-PCR verwendet wurde zur Bestimmung der Haplotypen (siehe Abbildung 57).

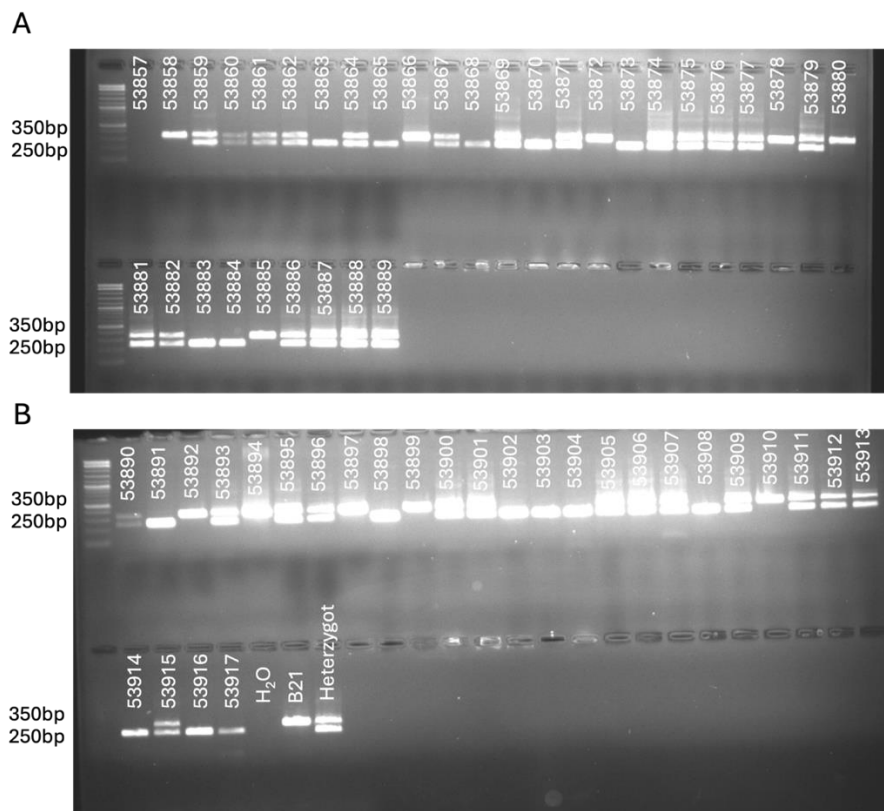
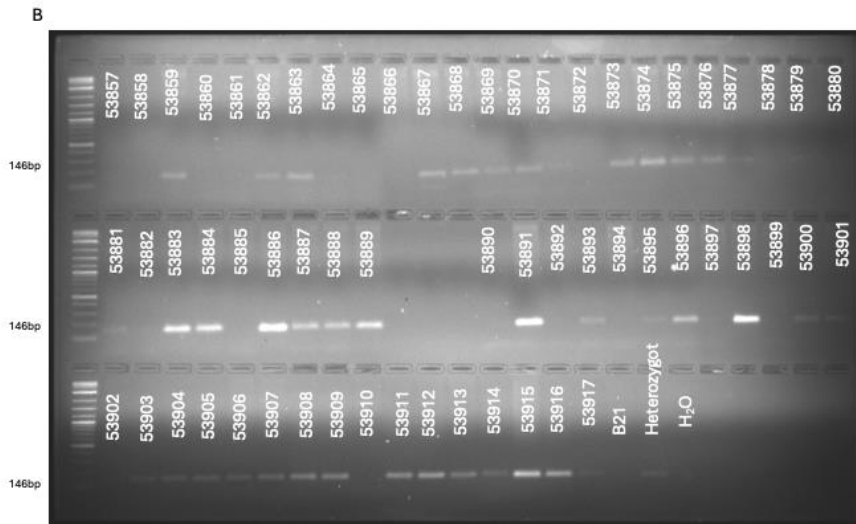
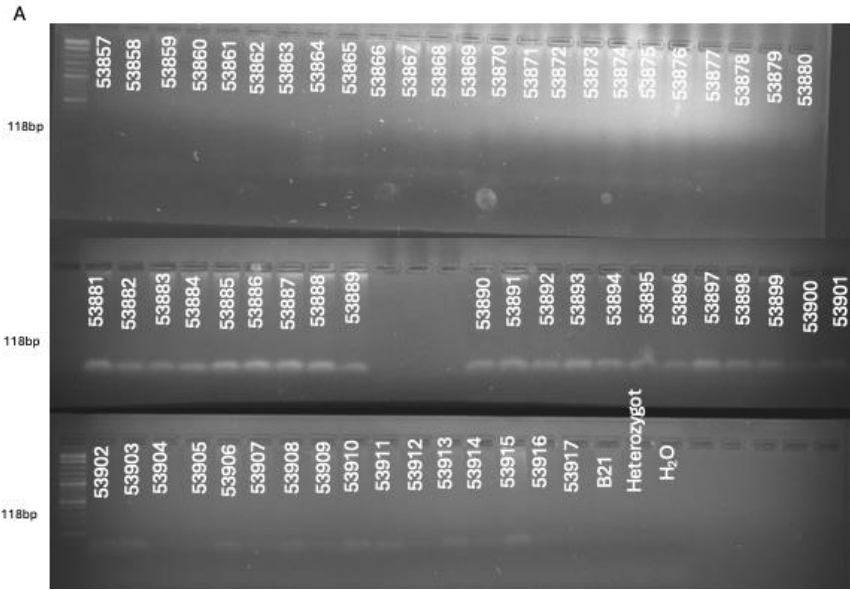


Abbildung 56: Microsatelite MHC-Haplotypisierung von A) Empfänger-TCR C γ KO-Hühnern und B) mCherry⁺ Spenderhühnern. Die Microsatelite-Primer 1679 und 1680 binden je nach Haplotyp unterschiedlich, sodass zwischen verschiedenen Haplotypen mit einer PCR unterschieden werden kann. Bei einer Amplikonlänge von 250bp kommen die Haplotypen B2, B9 und B15 in Frage. Bei einer Amplikonlänge von 350bp kommen die Haplotypen B21 und B36 in Frage. Und bei einer Amplikonlänge von >500bp ist es der Haplotyp B19



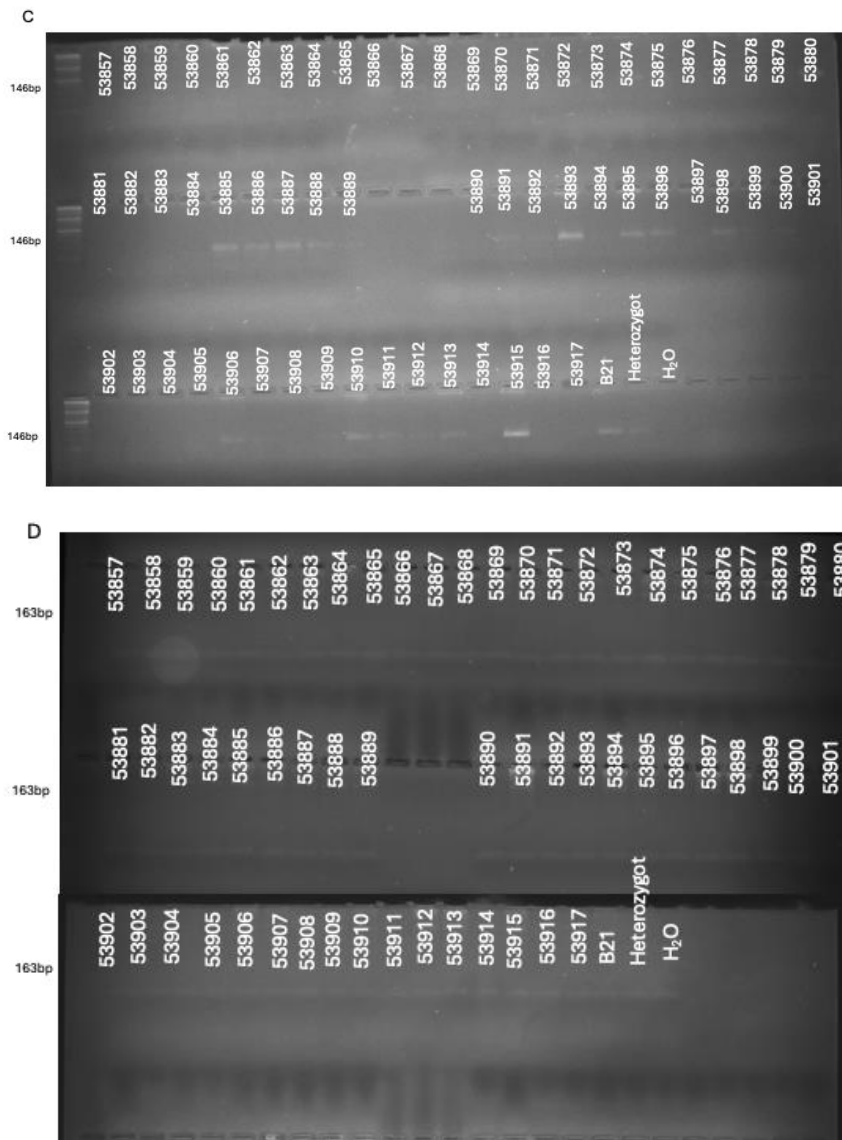


Abbildung 57: MHC-Haplotypisierung von TCR C γ KO- und mCherry⁺-Hühnern für A) B9 mit Primerpaar 1378+1379, B) B15 mit Primerpaar 1382+1383, C) B21 mit Primerpaar 1384+1385 und D) B43 Haplotypen mit Primerpaar 1386+1387.

6.3.2 Vereinzelte mCherry⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen in TCR C γ KO-Hühner nach adoptiven Transfer

Der MHC-Haplotyp der TCR C γ KO-Empfängerhühner und mCherry⁺-Spenderhühner wurden nach dem Schlupf bestimmt und gleiche MHC-Haplotypen für den Transfer ausgewählt. Vier Hühner erhielten eine hohe Dosis von $>9 \times 10^6$ $\gamma\delta$ T-Zellen, zwei erhielten eine mittlere Dosis von 4×10^6 bis 6×10^6 $\gamma\delta$ T-Zellen und drei Hühner erhielten eine geringe Dosis von $<1 \times 10^6$ bis 3×10^6 $\gamma\delta$ T-Zellen (siehe Tabelle 79). Die Reinheit der $\gamma\delta$ T-Zellen nach magnetisch assoziierter Säulensortierung (MACS) betrug zwischen 96,2% bis 99,0% mit Ausnahme einer Probe, die nur eine Reinheit von 43,3% besaß (siehe Tabelle 79). Zusätzlich wurden bei zwei TCR C γ KO- und drei Wildtyp-Hühner PBS als Kontrolle injiziert.

Tier	Reinheit von $\gamma\delta$ T-Zellen nach MACS	Zellzahl transferierter Zellen ($\times 10^6$)
1	97,8 %	4,17
2	98,8 %	9,3
3	98,6 %	10,2
4	98,5 %	10,725
5	96,0 %	3,858
7	96,7 %	2,625
9	99,0 %	6,135
10	43,3 %	0,052
11	96,2 %	9,9

Tabelle 79: Reinheit und Zellzahl transferierter mCherry* $\gamma\delta$ T-Zellen.

Es wurden in keiner der Gruppen (TCR $C\gamma^{-/-}$ geringe Dosis, mittlere Dosis, hohe Dosis) signifikante Unterschiede im Gewicht im Vergleich zu den WT- und TCR $C\gamma$ KO-Kontrolltieren, die PBS injiziert bekamen, festgestellt. Gemessen wurde an den Tagen 0, 3, 7, 14, 21 und 35 nach dem Transfer (siehe Abbildung 58). Darüber hinaus zeigten, die Tiere keine Anzeichen von abnormalen Verhalten, eine normale Futter- und Wasseraufnahme und ein gepflegtes Federkleid, sodass davon auszugehen ist, dass es nicht zu einer Graft-Versus-Host Reaktion kam

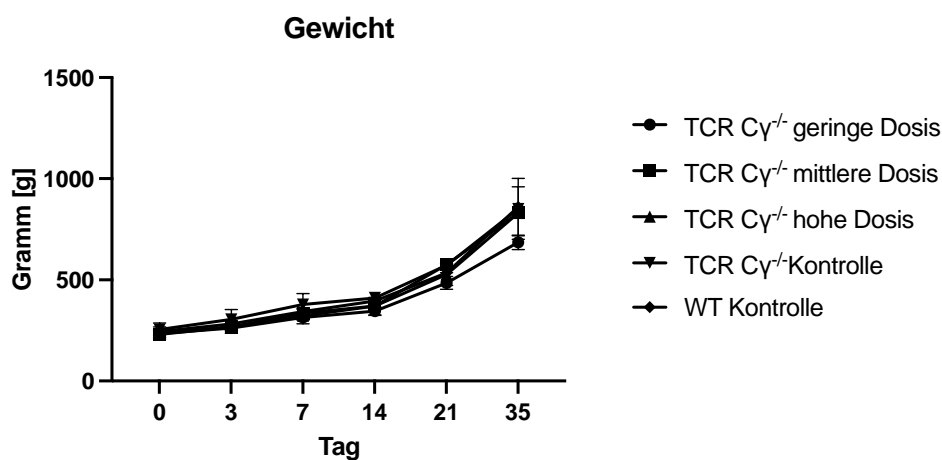


Abbildung 58: Gewichtsverlauf adoptiver Transfer von mCherry* $\gamma\delta$ T-Zellen in TCR $C\gamma$ KO-Hühner. Das Gewicht der Tiere wurde an Tag des Transfers, 3, 7, 14, 21 und 35 nach dem Zelltransfer der Tiere bestimmt. ($n=3$ * $p < 0.05$, one-way ANOVA)

Zu keinem Zeitpunkt während der Messungen an Tag 3, 8, 15, 23 und 35 konnten die mCherry⁺-transferierten Zellen im Blut der TCR $\gamma\delta$ KO-Tiere nach dem Transfer wiedergefunden werden (siehe Abbildung 59). Auch in der Milz der TCR $\gamma\delta$ KO-Tiere konnte weder an Tag 11 noch an Tag 35 mCherry⁺-Zellen nachgewiesen werden. Vereinzelt wurden mCherry⁺-Zellen im Thymus der transfizierten Tiere gemessen. Genauer wurden im Thymus von einem Tier, welches eine mittlere Dosis $\gamma\delta$ T-Zellen injiziert bekommen hatte, an Tag 11 nach dem Transfer 0,019% mCherry⁺-Zellen und 0,00409% doppelpositive TCR1⁺mCherry⁺-T-Zellen gefunden. Bei einem Tier mit einer hohen Dosis $\gamma\delta$ T-Zellen wurden 0,030% mCherry⁺-Zellen gefunden, die allerdings nicht TCR1⁺ waren (siehe Abbildung 60).

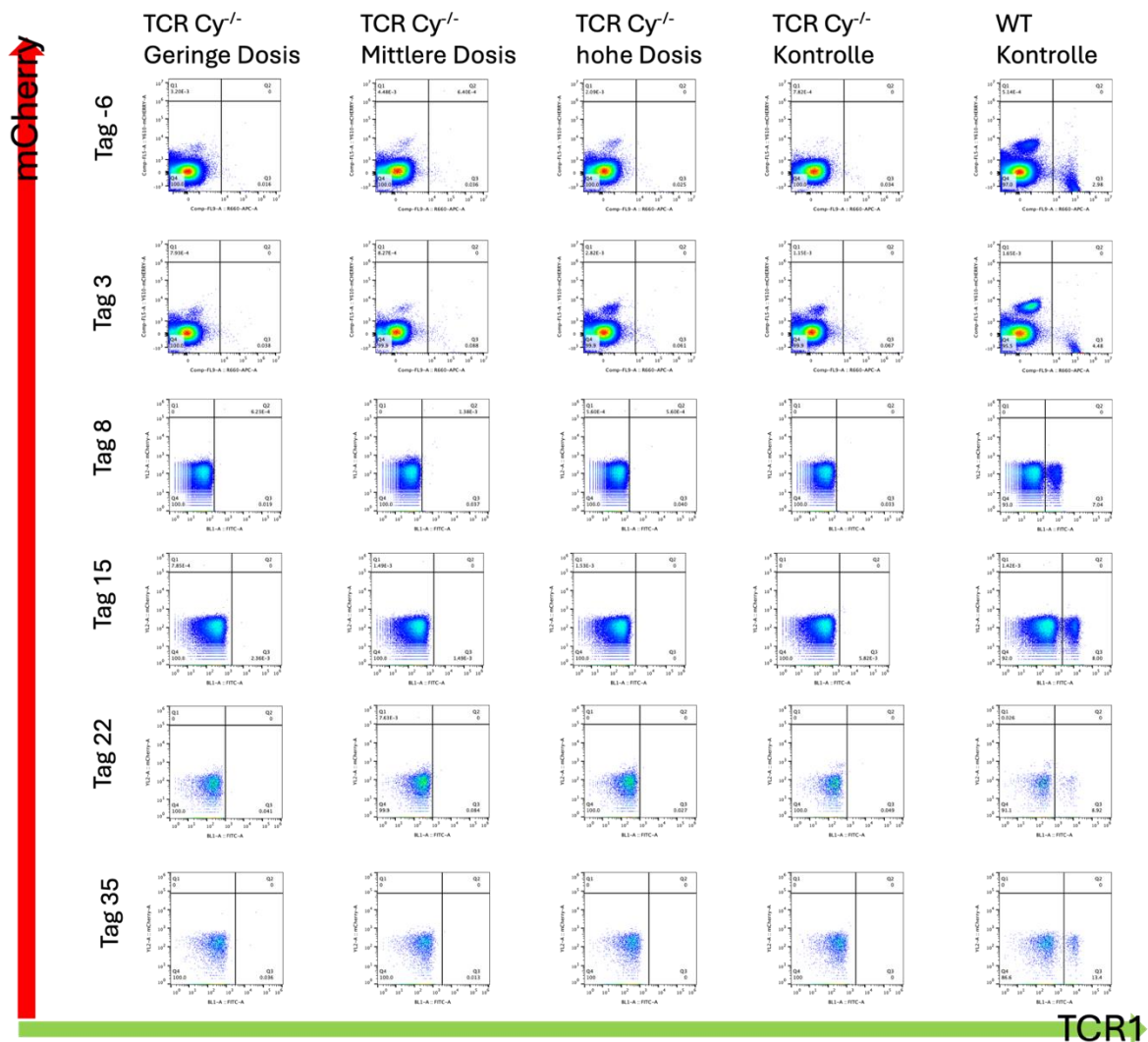


Abbildung 59: Repräsentative durchflusszytometrische Dotplots von PBMCs der Gruppen von TCR $\gamma\delta$ -Tieren mit geringer Dosis, mittlere Dosis und hohe Dosis transferierter Zellen und der TCR $\gamma\delta$ -Kontroll- sowie WT-Kontrolltiere (Tag -6 bis Tag 35 nach Transfer; n = 3) ist gezeigt. PBMCs wurden auf $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1-FITC) gefärbt und die Expression von mCherry⁺ Zellen wurde gemessen.

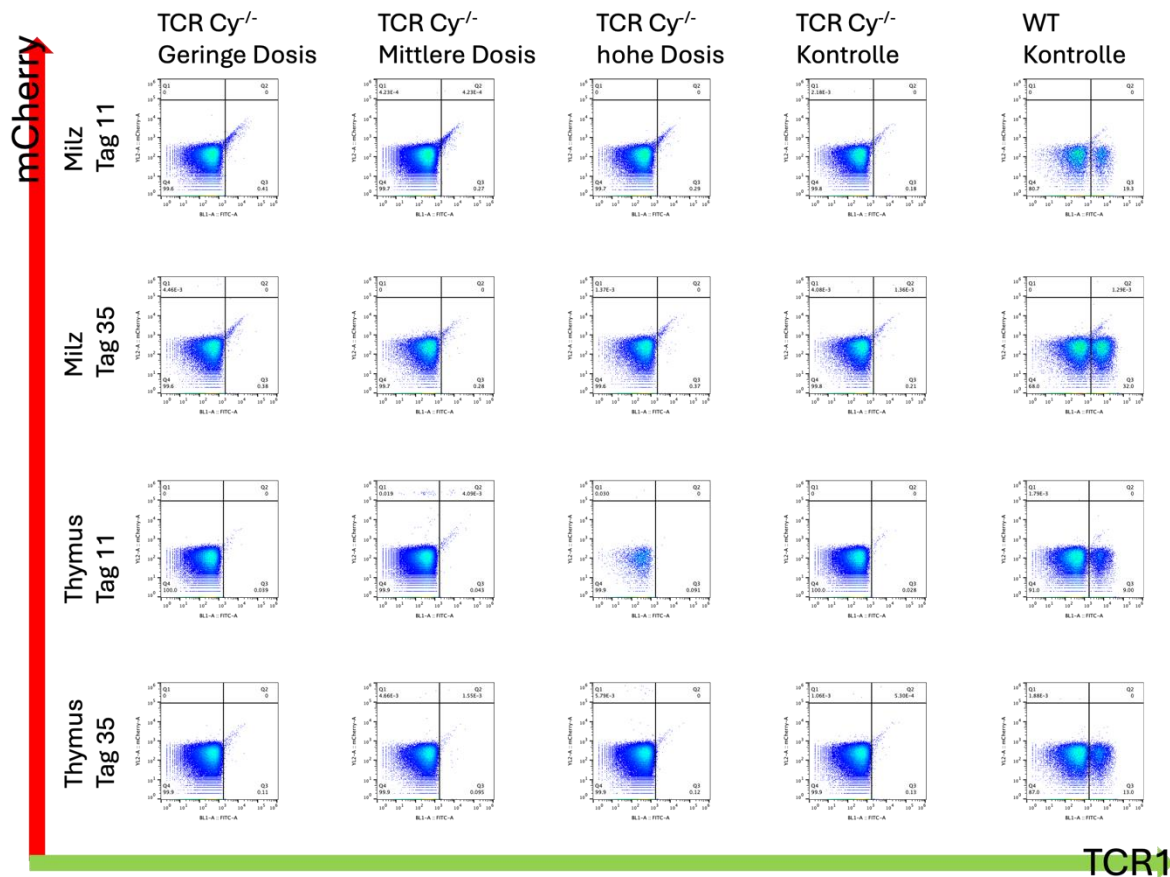


Abbildung 60: Repräsentative durchflusszytometrische Dotplots der Milz und Thymus nach Tag 11 und 35 von den Gruppen der TCR C $\gamma^{-/-}$ -Tieren mit geringer Dosis, mittlere Dosis und hohe Dosis transferierter Zellen und der TCR C $\gamma^{-/-}$ -Kontroll- sowie WT-Kontrolltiere (Tag 11 und Tag 35; $n \geq 1$) ist gezeigt. Zellen wurden auf $\gamma\delta$ T-Zellen (TCR1-FITC) gefärbt und die Expression von mCherry⁺-Zellen wurde gemessen.

6.3.3 Isolierung von mCherry⁺- $\alpha\beta$ T-Zellen aus Blut besser für Transfer geeignet

Der MHC-Haplotyp der TCR C β KO-Empfängerhühner und mCherry⁺-Spenderhühner wurden nach dem Schlupf bestimmt und Tiere mit gleichem MHC-Haplotyp für den Transfer ausgewählt. Fünf Hühner erhielten $\alpha\beta$ T-Zellen aus dem Thymus. Die Zellzahl variierte von $0,445 \times 10^6$ bis $5,7 \times 10^6$ $\alpha\beta$ T-Zellen mit einer Reinheit von 80,9% bis 92,0% (siehe Tabelle 80). In der nächsten Gruppe erhielten fünf TCR C β KO-Hühner $\alpha\beta$ T-Zellen aus der Milz mit einer Zellzahl von $0,54 \times 10^6$ bis $2,3 \times 10^6$ mit einer Reinheit von 72,6% bis 88,0% (siehe Tabelle 80). Als letztes erhielten vier TCR C β KO-Hühner $\alpha\beta$ T-Zellen isoliert aus Blut. Die Zellzahl variierte hier zwischen $0,24 \times 10^6$ bis $0,97 \times 10^6$ Zellen mit einer Reinheit von 94,8% bis 98,7% (siehe Tabelle 80). Zusätzlich wurden bei drei TCR C β KO- und drei Wildtyp-Hühner PBS zur Kontrolle injiziert.

Tier	Organ	Reinheit von $\alpha\beta$ T-Zellen nach MACS	Zellzahl transferierter Zellen ($\times 10^6$)
1	Thymus	91,5 %	1,15
2	Thymus	89,5 %	0,45
3	Thymus	85,9 %	2,16
4	Thymus	92,0 %	5,69
5	Thymus	80,9 %	2,43
6	Milz	82,8 %	1,14
7	Milz	83,8 %	2,23
8	Milz	87,3 %	0,81
9	Milz	88,0 %	1,04
10	Milz	72,6 %	0,54
11	Blut	94,8 %	0,38
12	Blut	98,2 %	0,97
13	Blut	98,7 %	0,87
14	Blut	97,5 %	0,24

Tabelle 80: Reinheit und Zellzahl transferierter mCherry $\alpha\beta$ T-Zellen.*

Bei der Isolierung von $\alpha\beta$ T-Zellen aus Blut wurde im Durchschnitt eine Reinheit von 97,30 ($\pm 1,74$) % erreicht, die im Vergleich zum Thymus mit 87,96 ($\pm 4,62$) % und zur Milz mit 82,90 ($\pm 6,17$) % signifikant höher war (siehe Abbildung 61). Die Anzahl der transferierten Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen. Aus dem Thymus konnten mit 2,38 ($\pm 2,01$) $\times 10^6$ Zellen die meisten $\alpha\beta$ T-Zellen aus einem Spendertier isoliert werden. Aus Milz konnten im Durchschnitt 1,15 ($\pm 0,65$) $\times 10^6$ Zellen und aus dem Blut konnten 0,62 ($\pm 0,36$) $\times 10^6$ Zellen isoliert werden (siehe Abbildung 61).

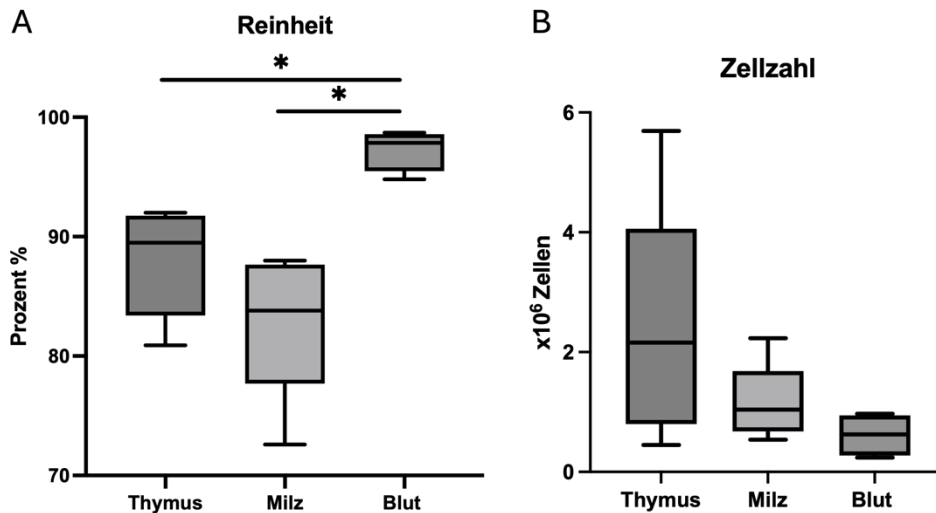


Abbildung 61: A) Reinheit und B) Zellzahl transferierter $mCherry^+$ - $\alpha\beta$ T-Zellen aus Thymus, Milz und Blut von $mCherry^+$ -Spendertieren. ($n \geq 4$ * $p < 0.05$, one-way ANOVA)

Das Gewicht der Tiere mit transferierten $\alpha\beta$ T-Zellen unterschied sich nicht von dem der TCR C β KO-Kontrolltiere (gemessen an Tag -1, 0, 3, 7 und 14 nach dem Transfer). Am Tag vierzehn betrug das Gewicht der TCR C β KO-Kontrolltiere 104,5 ($\pm 17,68$) g. Das TCR C β KO-Huhn, das Thymozyten injiziert bekam wog 104 ($\pm 0,00$) g, die TCR C β KO-Hühner, die T-Zellen aus der Milz bekamen wogen im Durchschnitt 99,25 ($\pm 28,32$) g und die TCR C β KO-Hühner die PBMCs transferiert bekamen wogen 105,33 ($\pm 22,81$) g. Damit waren die Durchschnittsgewichte geringer als bei den WT-Kontrolltiere, die im Durchschnitt 148,00 ($\pm 11,31$) g wogen. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant (siehe Abbildung 62).

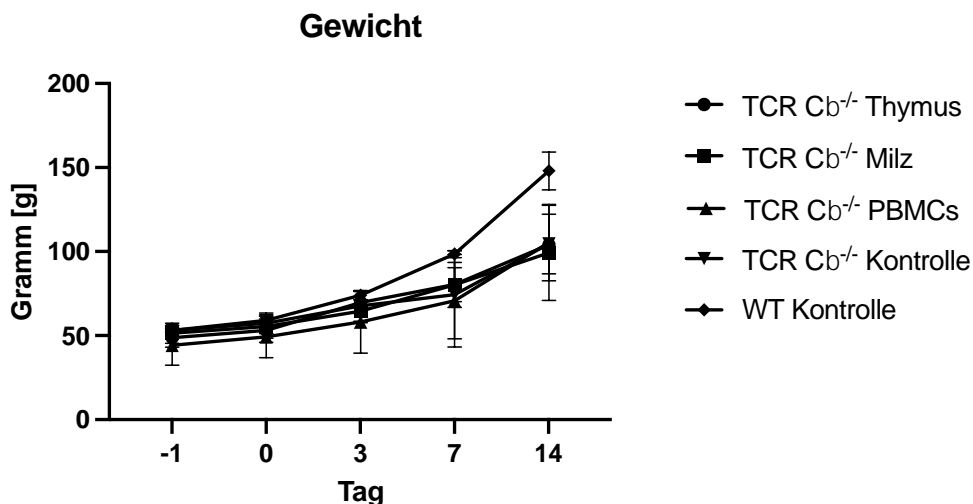


Abbildung 62: Gewichtungsverlauf adoptiver Transfer von $mCherry^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen in TCR C β KO-Hühner. Das Gewicht der Tiere wurde am Tag vor dem Transfer (-1), am Tag des Transfers (0) und an den Tagen 3, 7 und 14 nach dem Schlupf der Tiere bestimmt. ($n = 3$ * $p < 0.05$, one-way ANOVA)

Beim Transfer von $\alpha\beta$ T-Zellen aus Thymus, Milz und PBMCs in eine Woche alte TCR C β KO-Hühner konnten einzelne $mCherry^+$ -Populationen sieben Tage nach Transfer im Blut entdeckt werden. Genauer wurden in einem Tier, welches T-Zellen aus der Milz erhielt

0,057% doppelpositive mCherry⁺-TCR2+3⁺ Zellen und in einem Tier welches PBMCs erhielt 0,047% doppelpositive mCherry⁺TCR2+3⁺-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 63). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Zellzahl, Reinheit und dem Auftreten der Zellen festgestellt werden.

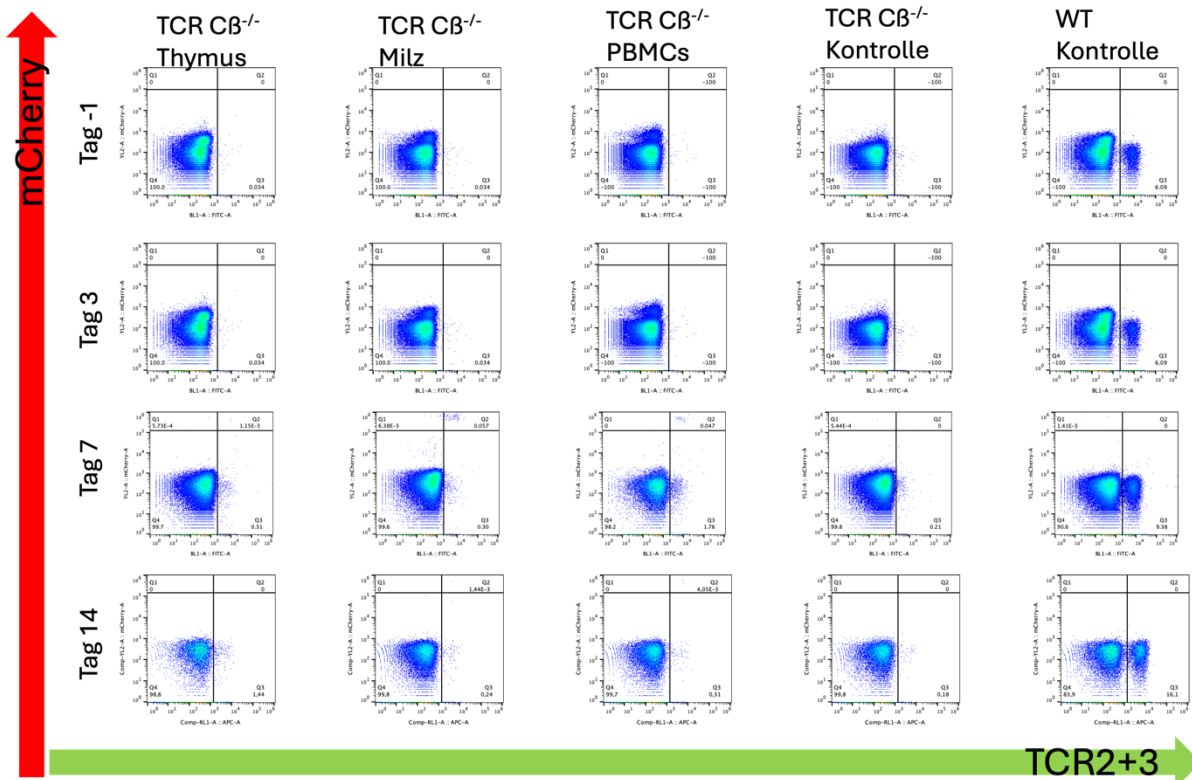


Abbildung 63: Repräsentative durchflusszytometrische Dotplots von PBMCs der Gruppen TCR Cβ^{-/-}-Hühner mit transferten Zellen aus Thymus (n≥1), Milz (n≥3) und PBMCs (n ≥ 3) und TCR Cβ^{-/-} Kontroll- sowie WT-Kontrollhühner n ≥ 3). Gezeigt wurde Tag -1, Tag 3, Tag 7 und Tag 14 nach Transfer. PBMCs wurden auf αβT-Zellen (TCR2+3) gefärbt und die Expression von mCherry⁺-Zellen wurde gemessen.

Nachdem die TCR Cβ KO-Hühner aus allen Gruppen vierzehn Tage nach Transfer der Zellen denselben Phänotypen wie die TCR Cβ KO-Kontrolltiere zeigten, wurde das Experiment abgebrochen. Thymus und Milz wurden auf das Vorhandensein von mCherry⁺-Zellen überprüft. Vor allem in der Milz wurden mCherry⁺-Populationen entdeckt. Bei einem TCR Cβ KO-Tier, welches T-Zellen aus der Milz erhielt, wurden 0,083% mCherry⁺-Zellen in der Milz gemessen. Bei einem TCR Cβ KO-Tier, welches T-Zellen isoliert aus dem Blut erhielt, wurden 0,021% doppelpositive mCherry⁺-TCR 2+3⁺ Zellen in der Milz gefunden (siehe Abbildung 64). Es konnten keine Zusammenhänge zwischen der Ausprägung des Phänotyps und der gefundenen mCherry⁺-Zellen festgestellt werden.

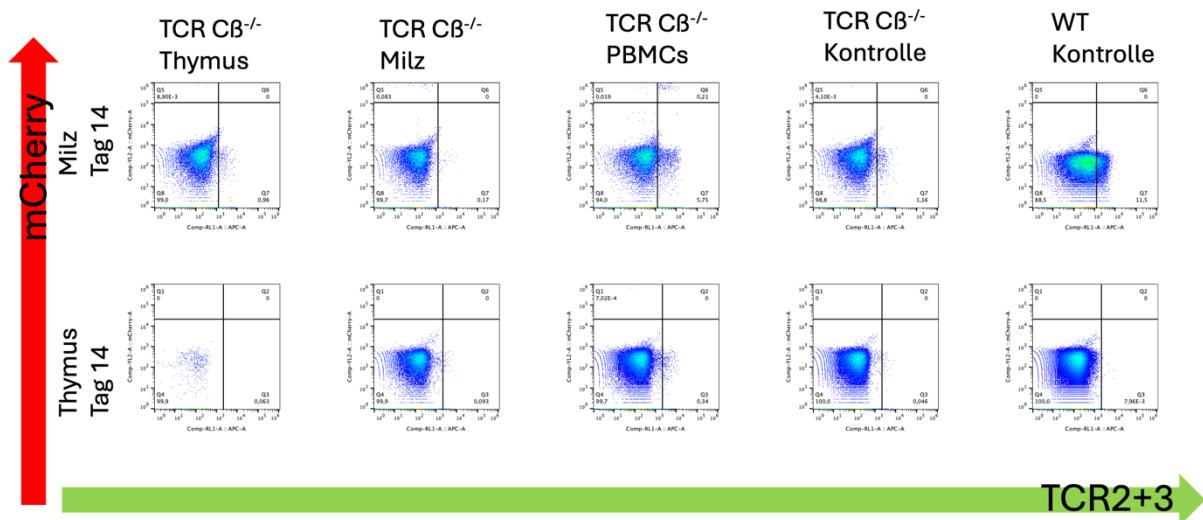


Abbildung 64: Repräsentative durchflusszytometrische Dotplots von Thymus und Milz der Gruppen $TCR C\beta^{-/-}$ -Hühner mit transferierten Zellen aus Thymus ($n \geq 1$), Milz ($n \geq 3$) und PBMCs ($n \geq 3$) und $TCR C\beta^{-/-}$ -Kontroll- sowie WT-Kontrollhühner ($n \geq 3$). Gezeigt wurde Tag vierzehn nach Transfer. Zellen wurden auf $\alpha\beta$ T-Zellen ($TCR2+3$) gefärbt und die Expression von $mCherry^+$ Zellen wurde gemessen.

6.3.4 $mCherry^+$ Thymozyten wandern nach Transfer in Thymus von $TCR C\beta$ KO-Embryos

Aufgrund der Erkenntnis, dass die $TCR C\beta$ KO-Hühner eine Woche nach Schlupf weiterhin Entwicklungsstörungen aufweisen, wurde auf ein *in ovo* Ansatz umgestellt. Damit wurde getestet, ob transferierte $mCherry^+$ -Zellen *in ovo* vom Hühnerembryo akzeptiert werden. Hierfür wurden Lymphozyten aus dem Thymus von ED12-Embryos gewonnen und *in ovo* in ED12 $TCR C\beta$ KO- und Wildtyp-Hühner injiziert. Eine Woche (ED19) später konnten sowohl im Blut als auch im Thymus des Embryos $mCherry^+$ -Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 65).

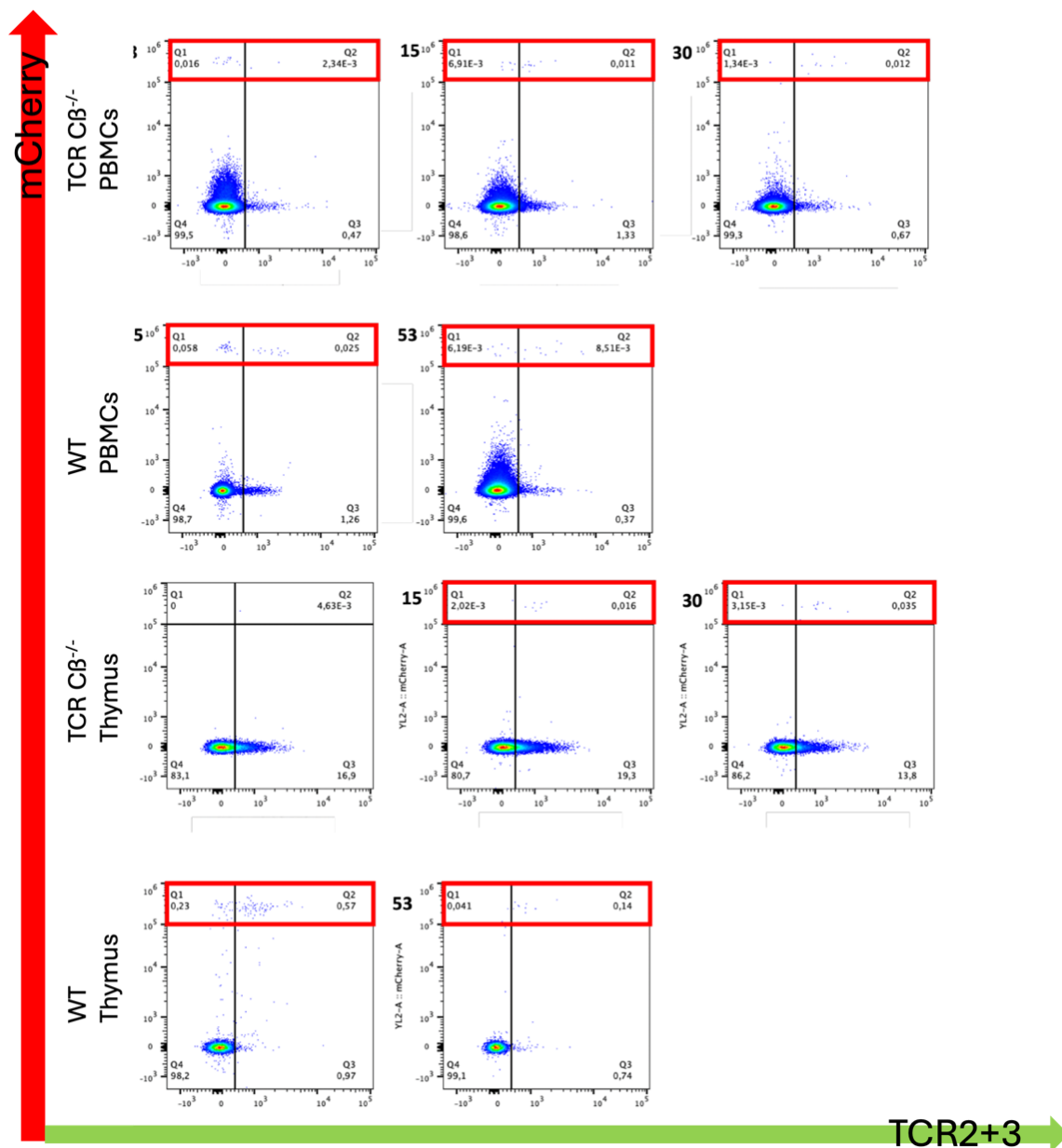


Abbildung 65: Repräsentative durchflusszytometrische Dotplots von PBMCs und Thymus von TCR Cβ^{-/-}-Embryos an ED19 mit transferierten Zellen aus Thymus sowie WT-Kontrolltiere mit transferierten Zellen aus Thymus (n ≥ 2) wurden gezeigt. Zellen wurden auf αβT-Zellen (TCR2+3) gefärbt und die Expression von mCherry⁺-Zellen wurde gemessen.

6.4 Generierung von CRE ER^{T2}-Chimären und einer loxP TCR Cβ^{KI}-Keimzelllinie

Um die Entwicklungsprobleme der TCR Cβ Knockout-Hühner zu umgehen, ist es sinnvoll ein induzierbares Knockout-Modell zu generieren, welches zu einem späteren Zeitpunkt angeschaltet werden kann. Hierfür wurde ein Cre-ER^{T2}-System gewählt, welches durch

die Gabe von Tamoxifen aktiviert wird [94]. Zusätzlich zu Cre-ER^{T2}-exprimierenden Hühnern, wurde eine loxP TCR C β Knockin-Hühnerzelllinie generiert.

6.4.1 Einfügung einer ER^{T2}-Cre-ER^{T2} Domäne in PGCs

Für die Erstellung wurden zunächst PGCs (LSL, Linie 9-2020) in einem Alter von 37 Tagen mit dem Plasmid #433 (siehe Tabelle 48, Tabelle 49) transfiziert. Um Einzelzellklone zu erhalten, wurden, die transfizierten Zellen auf einer 48-Wellplatte ausplattiert und mit Hygromycin selektiert. Hierbei wurden drei Einzelzellklone generiert. Aus jedem der drei Klone wurde gDNA gewonnen, um sowohl die Insertion der ER^{T2}-Cre-ER^{T2}-Domäne (siehe Abbildung 66A), als auch das Geschlecht mittels PCR zu bestimmen. Klon 1-3 zeigten eine Integration des Cre-Rekombinase-Gens und waren männlich (siehe Abbildung 66B).

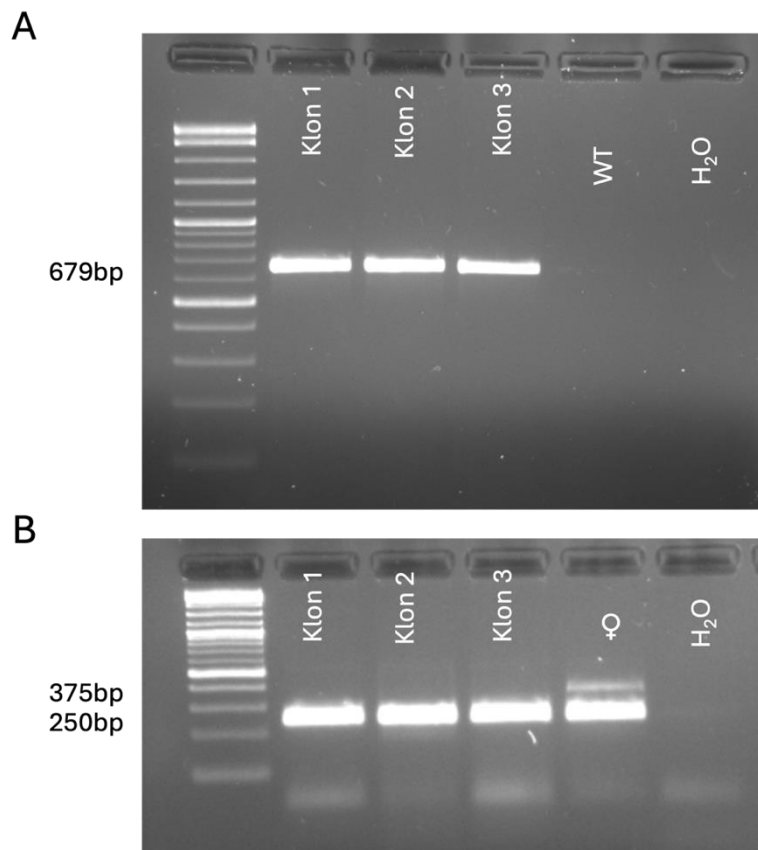


Abbildung 66: A) Genotypisierung und B) Geschlechtsbestimmung der Cre-ER^{T2}-PGC-Klone. DNA wird Promega Blood gDNA Miniprep System™ Kit aus PGC-Einzelzellklonen gewonnen. Die PCR zeigt die Integration von Cre und erzeugt eine Amplikonlänge von 679bp. Die Geschlechtsbestimmung zeigt bei männlichen Zellen eine Bande bei 250bp, während bei weiblichen Zellen eine zusätzliche Bande bei 375bp erscheint.

Mithilfe der Hygromycin-Resistenz-Kassette, welche die Cre-ER^{T2}-Klone besitzen, konnte daraufhin mittels einer ddPCR die Anzahl der Integrationen des Plasmids ermittelt

werden. Bei allen drei Cre-ER^{T2}-Klonen wurde eine Kopie der Hygromycin-Resistenzkassette gemessen (siehe Abbildung 67).

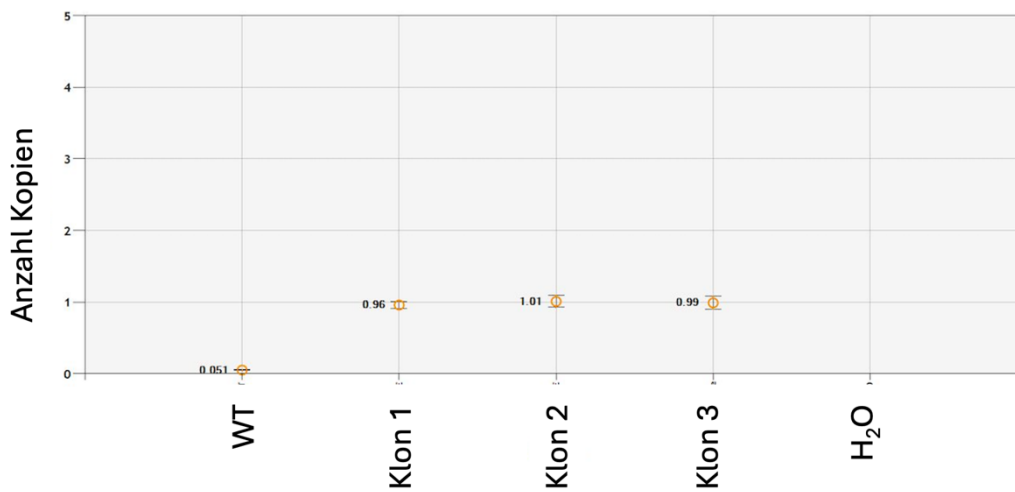


Abbildung 67: ddPCR zur Bestimmung der integrierten Kopien der Cre ER^{T2}-Klone 1-3 im Vergleich zu WT-DNA. Das Hygromycin-Resistenzgen wurde zur Bestimmung der Cre ER^{T2}-Integrationszahlen mittels ddPCR verwendet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der Kopienzahlen.

6.4.2 Positive Keimbahntransmission in Cre-ER^{T2}-Chimären

Alle drei Klone wurden für die Erstellung der Keimbahn-Chimären in 65h alte LSL-Wildtypembryos injiziert. Beim ersten Schlupf schlüpften 24 Tiere, davon waren sieben Tiere männlich. Vier dieser männlichen Tiere wurden mit Klon 2 injiziert und drei mit Klon 3 (siehe Abbildung 68A). Kein männliches Tier von Klon 1 wurde generiert, woraufhin die Injektion von Klon 1 wiederholt wurde. Beim zweiten Schlupf schlüpften neun Tiere, wovon vier männlich waren (siehe Abbildung 68B).

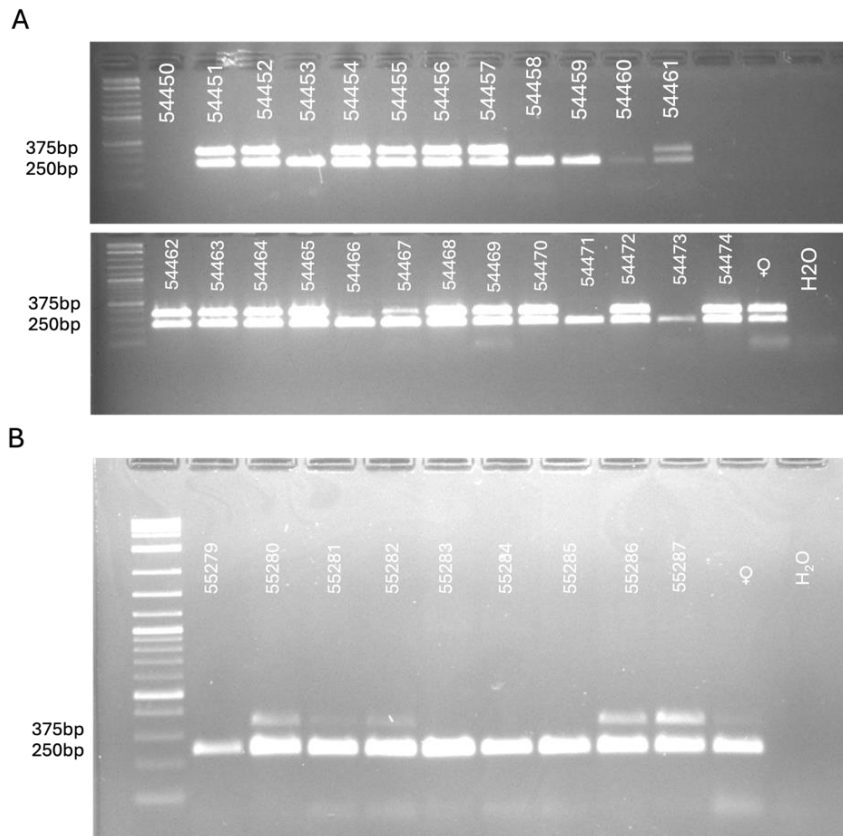


Abbildung 68: Geschlechtsbestimmung der geschlüpften Chimären von A) Klon 2 und 3 und B) Klon 1. Die Geschlechtsbestimmung zeigt bei männlichen Tieren eine Bande bei 250bp, während bei weiblichen Tieren eine zusätzliche Bande bei 375bp erscheint.

Im nächsten Schritt wurden die nicht geschlüpften Embryos und die Gonaden der weiblichen Tiere auf Cre-Integration mittels RT-PCR überprüft. 50% der Embryos zeigten Cre-Integration (siehe Abbildung 69A). Circa 61% der weiblichen Gonaden zeigte Cre-Integration (siehe Abbildung 69A). Nach Erreichen der Geschlechtsreife, wurden von den Chimären zweimal wöchentlich Spermaproben gewonnen. gDNA wurde aus den Spermaproben gewonnen und wurden auf Cre-Integration getestet. Aus allen Chimären konnte mehrfach ($n > 3$) die Cre-Integration nachgewiesen werden (siehe Abbildung 69B).

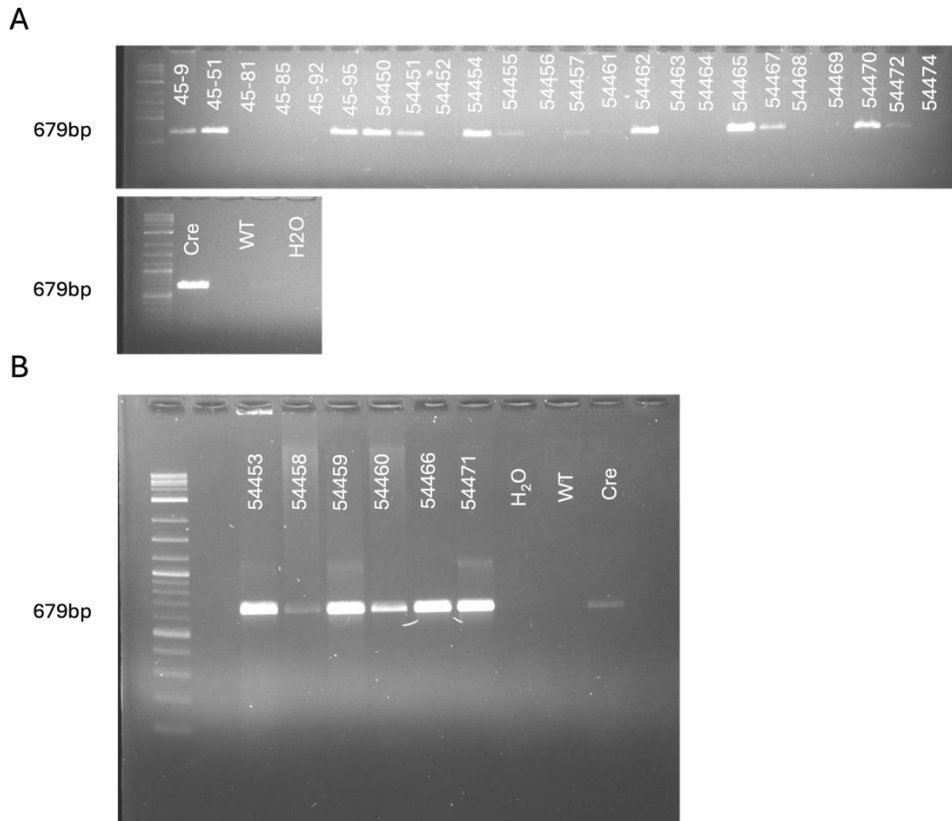


Abbildung 69: Überprüfung von A) nicht geschlüpften Embryos, weiblichen Gonaden und B) Spermaproben von Chimären auf Cre-ER^{T2}-Integration. DNA wurde mittels quick and dirty Methode aus Gewebe und Sperma gewonnen. Die PCR zeigt die Integration von Cre mit einer Amplikonlänge von 679bp.

Die Hähne Nummer 54458, 54459 und 54460 wurden daraufhin mit Wildtyp-Hennen verpaart, um im nächsten Schritt gDNA von Embryos im Alter von zehn Tagen auf Cre-Integration zu testen. Bei Hahn Nummer 54458 zeigten 80% der Embryos eine positive Cre-Integration, bei Hahn Nummer 54459 87,5% und bei Hahn Nummer 54460 39% (siehe Abbildung 70).

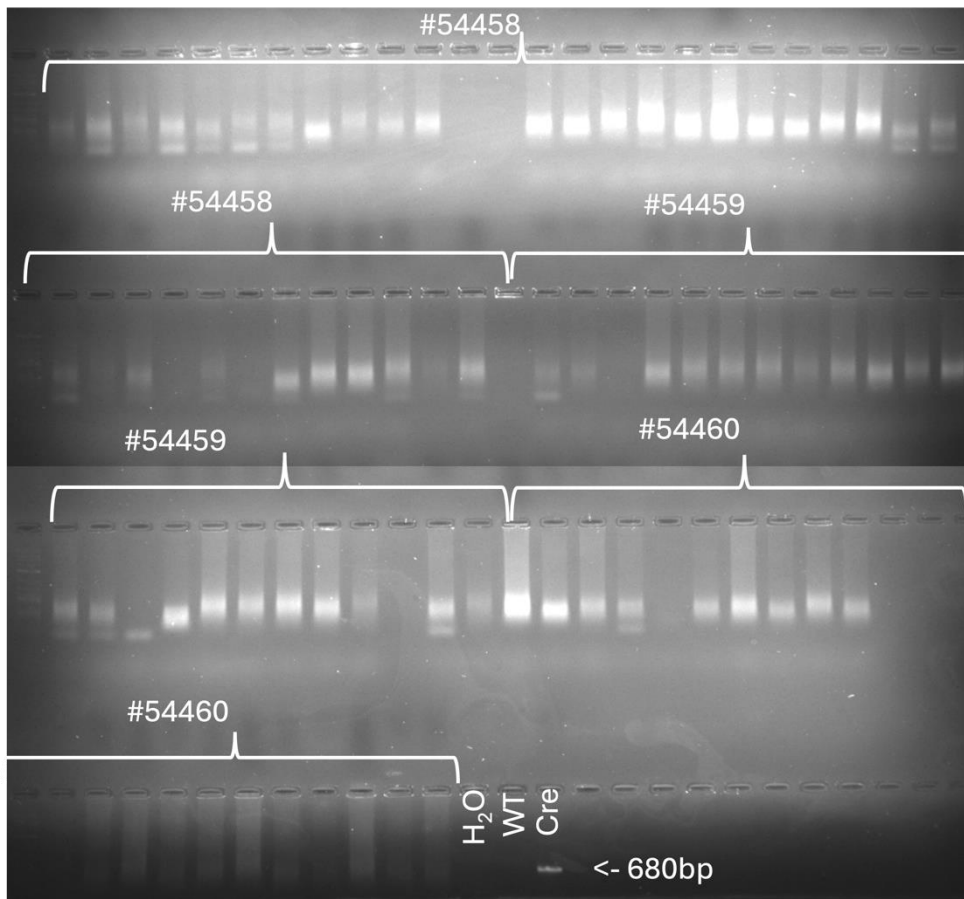


Abbildung 70: Überprüfung von Embryos an ED10 auf Cre-ER^{T2}-Integration. DNA wurde mittels quick and dirty Methode aus Gewebe gewonnen. Die PCR zeigt die Integration von Cre bei einer Amplikonlänge von 679bp.

6.4.3 Erstellung eines DNA-Templates zur Integration der loxP-Seiten

Zunächst wurden die Splice-Donor- und Splice-Akzeptor-Seiten um die konstante Region des T-Zell-Rezeptors mithilfe einer bioinformatischen Analyse der [Fruitfly.org-Webseite](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) prognostiziert. Daraufhin wurde das DNA-Template mithilfe von Benchling erstellt und durch die Firma Genewiz synthetisiert. Der Vektor wurde daraufhin in DH5 α -Bakterien transformiert, aufgereinigt und zur Kontrolle verdaut. Der Kontrollverdau wurde mit den Enzymen NheI-HF und Ahd-I durchgeführt, um das Plasmid anhand der Restriktionsstellen zu identifizieren. Der Verdau zeigt die erwarteten Banden bei 890bp und 3100bp (siehe Abbildung 71).

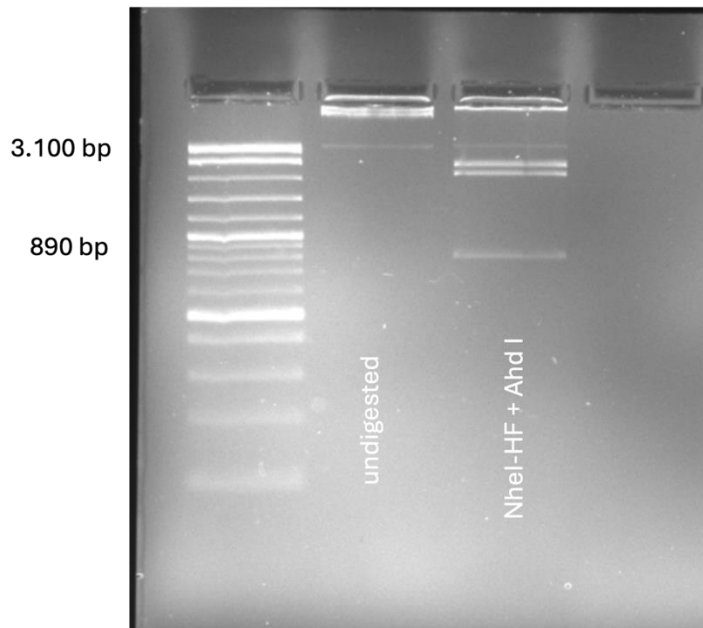
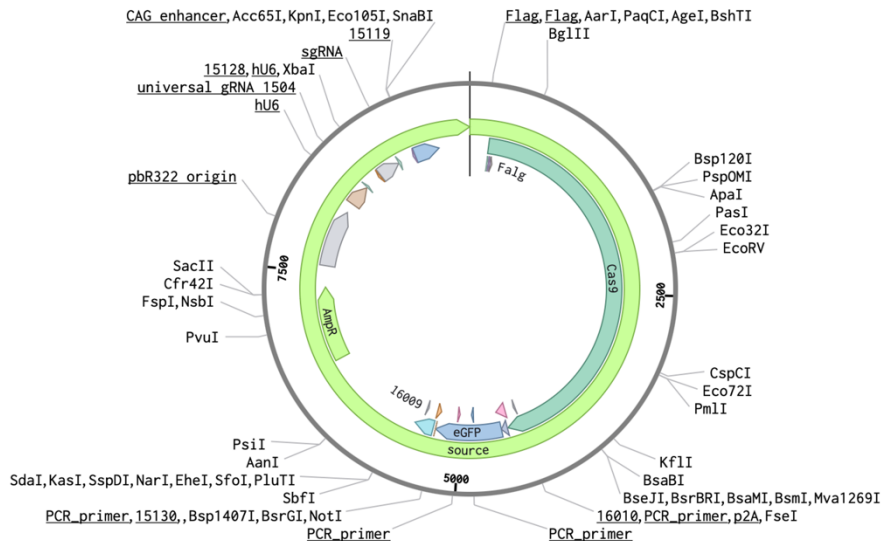


Abbildung 71: Verdau des DNA-Template des loxP TCR C β -Konstruktes. Durch die Zugabe der Verdauenzyme NheI-HF und Ahd I wurde das Plasmid an zwei Stellen geschnitten, sodass zwei DNA-Stücke mit einer Länge von 890 und 3100bp entstehen.

Abbildung 72A zeigt, den klonierten Vektor, der Cas9 und GFP enthält. Zudem enthält der Vektor eine universal guide-RNA zur Linearisierung des DNA-Template. Die sgRNA #1425, die auf Exon 1 der konstanten Region des T-Zell-Rezeptors bindet, wurde in den Cas9-Vektor integriert. Die korrekte Integration wurde durch Sangersequenzierung bestätigt (siehe Abbildung 72B).

A



B

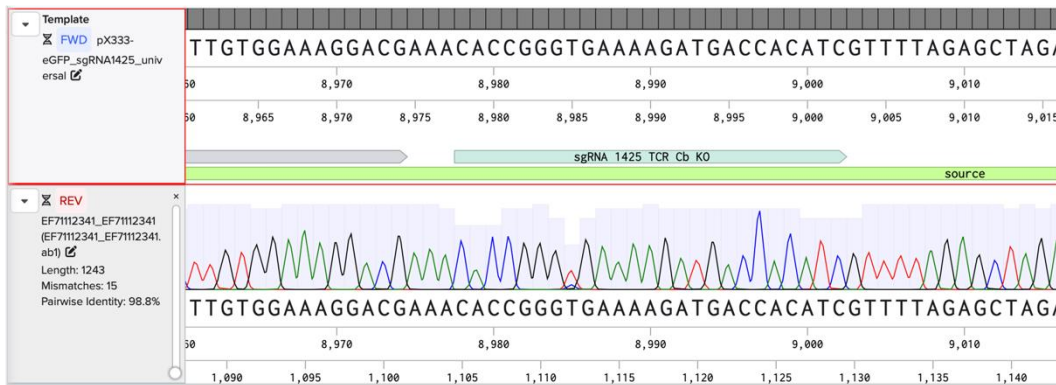


Abbildung 72: A) Klonierung der sgRNA 1425 in den Backbone Vektor pX333-egfp_universal. B) Ergebnisse der Sequenzierung zur Überprüfung der korrekten Integration der sgRNA 1425 in den Backbone Vektor.

6.4.4 Erstellung genetisch veränderter loxP TCR C β ^{KI}-PGCs

Für die Erstellung der genetisch veränderten PGCs wurden zunächst männliche Wildtyp-PGCs (LSL, Linie 9-2020) in einem Alter von 44 Tagen mit den zuvor generierten Plasmiden #467 und #469 (siehe Tabelle 48 und Tabelle 49) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 72h nach der Elektroporation mithilfe des CytoFlexSRT auf eGFP⁺ Zellen gesortet. Es wurden vier Einzelzellklone und zwei gepoolte Zellklone generiert. Primer (siehe Tabelle 44) zur Genotypisierung wurden mithilfe von Benchling designed. Die Genotypisierung zeigt, dass Klon 1 bis 3 und Pool 1 und Pool 2 die loxP Seite am 3' Ende integriert haben. Klon 4 zeigt keine Integration der loxP Seite (siehe Abbildung 73).

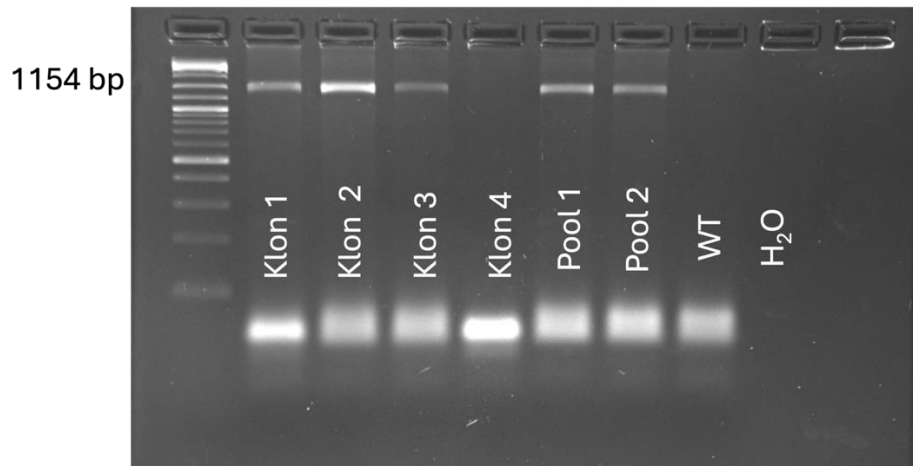


Abbildung 73: Genotypisierung der *loxP* TCR C β ^{KI}-Klone. DNA wird Promega Blood gDNA Miniprep System™ Kit aus PGC-Einzelzellklonen gewonnen. Die PCR zeigt die Integration von *loxP* TCR C β bei einer Amplikonlänge von 1154bp.

7 Diskussion

Obwohl die Trennung von B- und T-Zellen zuerst im Huhn entdeckt wurden, ist die weitergehende Charakterisierung der Rolle von $\alpha\beta$ T-Zellen in Säugetieren mittlerweile weiter fortgeschritten, als in Vögeln [11]. Sowohl in Säugetieren als auch in Vögeln spielen $\alpha\beta$ T-Zellen eine essentielle Rolle in der Pathogenabwehr [13]. Sie werden in $CD4^+$ -Helfer- und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen gegliedert [25]. Über die genaue Rolle der Subpopulationen ist im Huhn allerdings deutlich weniger bekannt [31]. Darüber hinaus besitzen Hühner einen deutlich höheren Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im Gegensatz zu Maus und Mensch [41]. Die Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen ist allerdings weitestgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen im Huhn mithilfe reverser Genetik untersucht. Ein Knockout der konstanten Region der β -Kette des T-Zell-Rezeptors führte zum kompletten Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen [91]. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Infektion mit *Eimeria tenella* analysiert. Des Weiteren wurde versucht ein adoptives Zell-Transferverfahren in Hühnern zu etablieren, um Rückschlüsse auf die Migration, Interaktion und Funktion der T-Zell Subpopulationen zu schließen. Als letztes wurden Keimbahnchimären für einen induzierbaren $\alpha\beta$ T-Zell-KO generiert, die später dem Zweck dienen sollen, die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen in Infektionen zu analysieren.

7.1 Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen führt zu ausgeprägtem Phänotyp der TCR $C\beta$ KO-Tiere

Die Generierung von Hühnern mit einem Knockout in der konstanten Region der β -Kette des TCR, sollte dazu dienen ein Tiermodell zu schaffen, welches ermöglicht die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen und deren Subpopulationen im Vogel zu analysieren. Der Phänotyp dieser Hühner zeigte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren stark ausgeprägte Krankheitssymptome, sodass es nach tierschutzrechtlichen Vorgaben nicht möglich war, die Tiere länger als ungefähr zwei Wochen zu halten (siehe Ergebnisse 6.1.3). Hierbei handelte es sich um Entzündungen der Haut (Granulome), der Milz und des Muskelmagens. Außerdem zeigten die Tiere eine verringerte lymphatische Entwicklung des Thymus und der Bursa (siehe Ergebnisse 6.1.5) [91].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knockout durch die Deletion der konstanten Region der β -Kette des TCR zur vollständigen Eliminierung der $\alpha\beta$ T-Zellen führt (siehe Ergebnisse 6.1.4) [91]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Cihak et al., der mittels Thymektomie und Antikörperblockierung die TCR2⁺ T-Zellpopulation in Hühnern reduzierte. Die Hühner in dieser Studie zeigten keinen krankhaften Phänotyp, da die Reduktion der TCR2⁺ T-Zellen zu einem Anstieg der TCR3⁺ T-Zellen führte. Außerdem wurden mit der Antikörperinjektion nur die ausgereiften TCR2⁺ T-Zellen eliminiert. Somit können zwar mittels dieser Methode die Unterschiede zwischen der V β 1⁺ und V β 2⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen analysiert werden [76], allerdings wurde ungleich zu den Ergebnissen in dieser Arbeit kein vollständiger Knockout generiert.

Cihak et al. konnte ebenfalls zeigen, dass durch die Blockierung von TCR2⁺ T-Zellen die IgA-Serumlevel um 10% verringert wurden [130], während in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass durch den Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen IgM, IgY und IgA in den TCR C β KO-Hühnern verringert war. Zudem wurde in der Studie von Cihak et al. der Thymus zwei bis acht Tage nach dem Schlupf der Hühner entfernt, somit konnte nicht festgestellt werden, ob der Thymus in Abwesenheit der V β 1⁺ T-Zelle die gleiche Entwicklung zeigt wie die Kontroll-Schlupfgeschwister [76]. Die TCR C β KO-Tiere in dieser Arbeit zeigten im Vergleich zu den WT-Tieren eine verminderte Entwicklung des Thymus in Abwesenheit der $\alpha\beta$ T-Zellen (siehe Ergebnisse 6.1.5) [91]. Interessanterweise konnten Cihak et al. zeigen, dass Thymektomie allein ausreicht, um $\gamma\delta$ T-Zellen vollständig zu eliminieren [76], während die verminderte Entwicklung des Thymus in TCR C β KO-Hühnern zu keiner Reduzierung der Frequenz von TCR1⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen führte [91].

Dagegen zeigen Hühner mit einer Depletion im rekombinationsaktivierenden Gen (RAG)-1 einen ähnlichen Phänotyp wie die TCR C β KO-Hühner [131]. RAG-1 ist eine Endonuklease, die die V(D)J-Rekombination aktiviert und somit für die Bildung von sowohl T- als auch B-Zellen notwendig ist. Hierbei konnte nicht unterschieden werden, durch welche Zellen der inflammatorische Phänotyp ausgelöst wurde [131]. In TCR C β KO-Tieren wurden ebenfalls wie auch in den RAG-1-KO-Tieren Entzündungen in der Milz festgestellt (siehe Ergebnisse 6.1.3) [91]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust der CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen in den TCR C β KO-Tieren (siehe Ergebnisse 6.1.4) zu einer

verringerten humoralen Abwehr mit weniger B-Zellen (siehe Ergebnisse 6.1.4) und geringeren Ig-Serumleveln führte (siehe Ergebnisse 6.1.6). Gleichzeitig ist ein Anstieg der zytotoxischen Abwehr zu sehen mit einer höheren Frequenz an $CD8^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen und Monozyten (siehe Ergebnisse 6.1.4), was vermutlich zum inflammatorischen Phänotyp führte, [91].

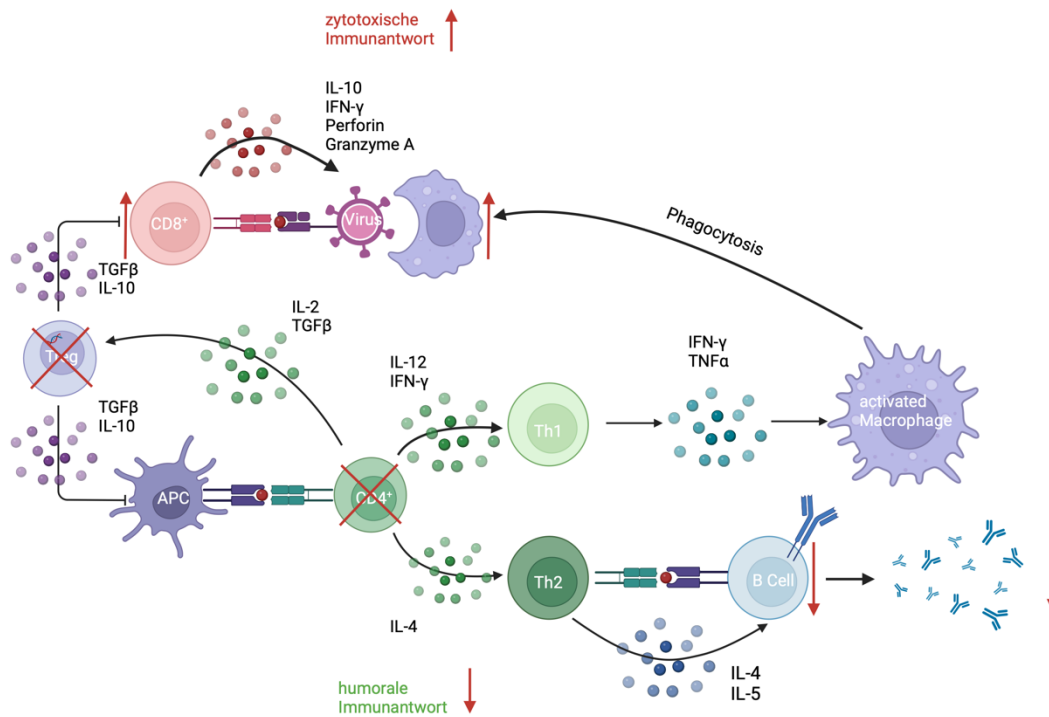


Abbildung 74: Veränderungen der zytotoxischen und humoralen Immunantwort in den TCR C β KO-Hühnern. Die humorale Immunantwort in den TCR C β KO-Tieren ist erniedrigt, durch die fehlenden CD4⁺ T-Zellen, die zu einer geringeren B-Zellantwort mit niedrigeren Ig-Leveln führt. Auf der anderen Seite ist eine Erhöhung der CD8⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen und Makrophagen zu sehen, durch die fehlende Regulierung der T_{reg}-Zellen. Die roten Pfeile und Kreuze markieren die Veränderungen in den TCR C β KO-Hühnern im Vergleich zu den WT-Tieren.

In Mäusen wurde sowohl bei TCR $\alpha^{-/-}$ als auch bei TCR $\beta^{-/-}$ Mäusen eine Kolitis festgestellt [71], allerdings wurde bei TCR $\alpha^{-/-}$ Mäusen die Bildung von germinalen Zentren beobachtet, während TCR $\beta^{-/-}$ Mäuse, wie auch TCR C β KO-Hühner, nicht in der Lage sind germinale Zentren zu bilden [72] (siehe Ergebnisse 6.1.5). Es bleibt also offen zu analysieren, ob der Knockout der α -Kette in Hühnern wie bei Mäusen zu einem mildereren Phänotyp führt. In Säugetieren und in Vögeln ist bereits bekannt, dass die β -Kette im Gegensatz zu der α -Kette an der Bildung des pre-TCR beteiligt ist. Der pre-TCR wiederum ist in der Entwicklung des Thymus involviert [28]. Es bleibt dabei unklar, welche Rolle die β -Kette in der Bildung der germinalen Zentren spielt und ob die TCR C α KO-Hühner wie auch die TCR $\alpha^{-/-}$ Mäuse germinale Zentren bilden können. Ebenfalls wurde bei sogenannte scid Mäusen, die

einen Knockout im Transkriptionsfaktor FoxP3 der regulatorischen T_{reg} Zellen besitzen, ein ähnlich ausgeprägter Phänotyp beobachtet. Die TCR C β KO-Hühner zeigten signifikant niedrigere Werte für FoxP3⁺ und CD4⁺ T-Zellen (siehe Ergebnisse 6.1.4,6.1.7). Somit kann geschlussfolgert werden, dass vor allem der Verlust der CD4⁺ T-Zellen, inklusive der T_{reg}, zu einem immunologischen Ungleichgewicht führte, das an dem schwerwiegenden Phänotyp der TCR C β KO-Tieren beteiligt ist.

Bei der Betrachtung der lymphatischen Organe im Hühnerembryo wurden keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtypembryo festgestellt (siehe Ergebnisse 6.1.2). Dies liegt möglicherweise daran, dass die Entwicklung der lymphatischen Organe beim Schlupf der Tiere noch nicht abgeschlossen ist. So entwickelt sich der Thymus im Huhn beispielsweise bis zum vierten Lebensmonat und die Bursa erreicht ihre maximale Größe nach acht bis zehn Wochen nach dem Schlupf. Hierbei entwickelt sich die klare Abgrenzung zwischen dem Kortex und der Medulla in Bursa und Thymus [17, 63].

Der krankhafte Phänotyp der TCR C β KO-Hühner wird circa zwei Wochen nach dem Schlupf deutlich, durch die granulomatösen Entzündungen an der Haut. Unklar ist hierbei, welcher Stimulus den Phänotyp der TCR C β KO-Hühner auslöst. Da die Tiere unter SPF-Bedingungen gehalten werden, können zwar spezifische Pathogene als Auslöser ausgeschlossen werden, durch die starke Immunsupprimierung der TCR C β KO-Hühner ist allerdings nicht auszuschließen, dass Umweltkeime der Auslöser für den Phänotyp sind. Durch eine Kultivierung der Milz bei unter SPF-Bedingungen geschlüpften TCR C β KO-Hühnern konnten bakterielle Keime als Stimulus für den Phänotyp ausgeschlossen werden. Genauer konnten bei der Kultivierung der Milzproben weder aeroben noch mikroaerophile Bakterien angezüchtet werden (siehe Ergebnisse 6.1.9). Es konnten allerdings hierbei keine anaeroben Keime ausgeschlossen werden. Die Milz ist allerdings kein Organ in dem typischerweise Infektionen mit Anaerobiern auftreten, sodass diese nicht zwingend dort zu erwartet sind. Außerdem wären fakultativ anaerobe Bakterien unter aeroben Kulturbedingungen ebenfalls nachweisbar gewesen [132]. Um auch virale, oder parasitäre Auslöser auszuschließen, müssten die Hühner allerdings unter keimfreien Isolatorbedingungen gehalten werden. Ebenfalls wäre es denkbar, dass endogene Retroviren durch das Fehlen der $\alpha\beta$ T-Zellen aktiviert worden sind und damit

den krankhaften Phänotyp auslösen, da chronische Dysregulationen der zellulären Homöostase zur Aktivierung der Retroviren führen kann [133].

Im nächsten Schritt wurde eine zytotoxische Reaktion der $\gamma\delta$ T-Zellen als Auslöser für den krankhaften Phänotyp ausgeschlossen, indem TCR C γ KO- und TCR C β KO-Tiere miteinander verpaart wurden. Die so generierten Doppel-KO-Tiere besaßen weder $\gamma\delta$ noch $\alpha\beta$ T-Zellen (siehe Ergebnisse 6.1.10). Allerdings zeigten auch diese Hühner zwei Wochen nach dem Schlupf denselben Phänotyp. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen an der zytotoxischen Reaktion beteiligt sind. Bei dieser Verpaarung wurden nach Mendelschen Regeln Doppel-KO-Hühner im Verhältnis von 1:16 generiert. Durch dieses ineffiziente Verhältnis war es allerdings schwierig eine ausreichend große Zahl an Tieren zu schlüpfen. Daher wurde die Durchflusszytometrische Analyse in dieser Arbeit mit einem n=1 der Doppel-KO-Tiere durchgeführt. Aufgrund des krankhaften Phänotyps der Tiere, wurde das Experiment aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht wiederholt. Insgesamt kann trotzdem geschlossen werden, dass sowohl pathogene Bakterien als auch $\gamma\delta$ T-Zellen als Stimulus für den Phänotyp ausgeschlossen werden.

Es bleibt offen zu analysieren, ob Hühner mit einem Knockout der α -Kette des TCR oder ein induzierbarer TCR C β KO zu milderem Phänotyp führt. Während ein TCR C α KO-Huhn es ermöglicht gleichzeitig Rückschlüsse über die Rolle der β -Kette in der Entwicklung der lymphatischen Organe im Huhn genauer zu entschlüsseln, ist unklar, ob die Tiere nicht ebenfalls einen krankhaften Phänotyp entwickeln. Der Vorteil eines induzierbaren Knockouts bestünde darin, dass die Tiere zunächst mit funktionellen $\alpha\beta$ T-Zellen schlüpfen, sodass eine normale Entwicklung der lymphatischen Organe stattfinden kann. Durch die Gabe von Tamoxifen könnte der Knockout beliebig aktiviert werden. Diese Methode wird beispielsweise bei FoxP3 KO-Mäusen eingesetzt [73].

Trotz des ausgeprägten Phänotyps können mithilfe der TCR C β KO-Tiere Rückschlüsse auf die Funktionen der $\alpha\beta$ T-Zellen und Interaktion auf andere Lymphozyten-Populationen geschlossen werden, die im Folgenden diskutiert werden.

7.1.1 Die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen im Huhn

Zunächst konnte bei der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt werden, dass der Knockout der $\alpha\beta$ T-Zellen nicht zur Bildung von nicht charakterisierten $CD3^+$ T-Zellen führt. Nicht charakterisierte T-Zellen könnten beispielsweise $CD3^+$ -Zellen sein, die allerdings negativ für TCR1, 2 oder 3 sind. Es könnte aber auch zur Bildung eines nicht charakterisierten TCR kommen, durch die Zusammenlagerung von der α -Kette mit einer weiteren α -Kette oder einer δ -Kette. Da keine nicht charakterisierte T-Zellpopulation vorhanden war, werden vermutlich die Vorläufer T-Zellen in den TCR C β KO bei der Selektion im Thymus nach unvollständiger Bildung des T-Zell-Rezeptors in Apoptose geschickt [65].

Die Bildung der $\gamma\delta$ T-Zellen, ist weder durch das Fehlen der $\alpha\beta$ T-Zellen noch durch die Unterentwicklung des Thymus beeinflusst. Cihak et al. zeigte, dass durch Thymektomie TCR1 $^+$ defizitäre Hühner generiert werden konnten [76]. Hieraus kann geschlossen werden, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen den Thymus als Ort für die T-Zell-Ausreifung benötigen, aber ausgehend von den Ergebnissen in dieser Arbeit für die Reifung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Thymus keine klare Trennung zwischen Kortex und Medulla notwendig ist.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen den Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen nicht kompensieren, was darauf hinweist, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen nicht vollständig die Funktion der $\alpha\beta$ T-Zellen übernehmen können. Bei den TCR C γ KO-Hühnern konnte gezeigt werden, dass die $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen den Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der IEL ausglich [91]. Bei genauerer Charakterisierung der $\gamma\delta$ T-Zellen wurden signifikant mehr $CD8a^{high+}$ und $CD8a^{dim+}$, aber nicht mehr $CD8^{neg-}$ Zellen in den TCR C β KO-Hühnern gefunden. Dies wiederum könnte ein kompensatorischer Effekt sein, bei welchem die $CD8^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen Aufgaben der $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen übernehmen, ähnlich wie bei den TCR C γ KO-Tieren [91]. Die signifikante Erhöhung der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz und Thymus, kann durch die relative Auswertung der Durchflusszytometrie erklärt werden. Durch das Fehlen der $\alpha\beta$ T-Zellen, werden andere Lymphozyten-Populationen relativ gesehen größer. Um dieses Problem zu umgehen könnte mithilfe einer Vollblutfärbung eine absolute Auswertung durchgeführt werden [134].

Außerdem wurden signifikant weniger B-Zellen in den PBMCs der TCR C β KO-Hühner gefunden, sowie niedrigere Genexpressionslevel von antiinflammatorischen Interleukinen, wie IL-4 und IL-5, als auch niedrigere IgM, IgY und IgA Immunglobulin Level. Diese Beobachtungen können auf das Fehlen der CD4⁺ T-Zellen zurückgeführt werden, da diese durch die Sekretion von IL-4 und IL-5 B-Zellen zur Antikörperbildung aktivieren. Somit kann spekuliert werden, dass die humorale Infektionsabwehr durch den Verlust der CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen deutlich verringert ist [25, 135]. Im Menschen führt die Blockierung von IL-4 auch zu verringerten Serumimmunglobulinen wie IgE, was in der Therapie von Asthma oder Atopischer Dermatitis genutzt wird [136].

Auf der proinflammatorischen Seite wurden signifikant mehr Monozyten im Blut gefunden, sowie signifikant mehr Makrophagen in der Bursa und höhere Expressionswerte für IL-1 β und IL-6. Diese lassen sich vermutlich durch das Fehlen der T_{reg} Zellen erklären, die durch das Ausschütten von TGF β Entzündungsreaktionen regulieren [137]. Im Menschen zählt IL-6 zu den Schlüsselfaktoren bei chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen [138]. Durch die erhöhten IL-6 Werte in den TCR C β KO-Tieren kann vermutet werden, dass es sich um eine autoimmune Entzündungsreaktion handelt. Zwar zählt IL-22 zu den proinflammatorischen Interleukinen, wird jedoch durch CD4⁺ Zellen produziert. Daher lassen sich die signifikant niedrigeren IL-22 Werte durch das Fehlen der CD4⁺ Zellen erklären [123].

Die Analyse der T-Zell-Aktivierungsmarker der verbliebenen $\gamma\delta$ T-Zellen in den TCR C β KO-Hühnern, zeigte dass die frühen Aktivierungsmarker CD25 und MHC II signifikant niedriger sind an Tag eins und zwei im Vergleich zu Wildtyp-Hühnern (siehe Ergebnisse 6.1.8). In Mäusen sind $\gamma\delta$ T-Zellen am Priming der $\alpha\beta$ T-Zellen via Antigenpräsentation beteiligt [139]. Antigene werden generell durch die Expression vom MHC II-Komplex für CD4⁺ T-Zellen präsentiert [25]. Durch das Fehlen der $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren die $\gamma\delta$ T-Zellen in den TCR C β KO-Hühner demnach weniger MHC II nach der Stimulierung (siehe Ergebnisse 6.1.8). Über die Expression von CD25 in $\gamma\delta$ T-Zellen ist nicht viel bekannt, außer dass es in frühen $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird, bevor sie zu Effektorzellen selektiert werden [140]. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass $\alpha\beta$ T-Zellen bei der Selektion der

$\gamma\delta$ T-Zellen eine Rolle spielen, sodass der Verlust der $\alpha\beta$ T-Zellen zu niedrigeren Werten von CD25⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen führen.

Granzym B ist ein Protein welches durch Poren, die durch Perforin gebildet werden, in Zellen eindringt, um Apoptose zu induzieren. Daher sind Granzym B und Perforin häufig in Autoimmunkrankheiten und Entzündungsreaktionen involviert [141]. Wie bereits geschildert (siehe Diskussion 7.1), sind die $\gamma\delta$ T-Zellen nicht für die überschießende zytotoxische Reaktion in den TCR C β KO-Tieren verantwortlich, da die Doppel-KO-Tiere denselben Phänotyp zeigten (siehe Ergebnisse 6.1.10). Daher ist es nicht überraschend, dass in den TCR C β KO-Tieren nur leicht erhöhte Werte für Perforin und Granzym B innerhalb der CD3⁺-Population gefunden wurden.

Zusammengefasst beeinflussen die $\alpha\beta$ T-Zellen andere Immunzellen wie B-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und Monozyten und sind an der Entwicklung der lymphatischen Organe beteiligt. Durch den Knockout der $\alpha\beta$ T-Zellen ist vor allem die humorale Immunabwehr stark beeinträchtigt und eine Regulation der zytotoxischen Immunantwort fehlt (siehe Abbildung 74).

7.2 $\gamma\delta$ T-Zellen spielen keine essenzielle Rolle in der Infektion mit *Eimeria tenella*

$\gamma\delta$ T-Zellen werden in Vögeln vor allem im Blut, in der Milz und in den intestinalen Epithelien gefunden [142]. Hühnern besitzen hier im Vergleich zu Mensch und Maus eine hohe Frequenz an $\gamma\delta$ T-Zellen [41]. Allerdings ist die Rolle von $\gamma\delta$ T-Zellen insbesondere bei Infektionen wie *Eimeria tenella* noch unbekannt.

Während bursektomierte Hühner, die keine Antikörper produzieren können, im Challenge-Experiment trotzdem resistent gegen *Eimeria tenella* sind [143], konnte in athymischen Ratten gezeigt werden, dass diese ohne T-Zellen einer Sekundärinfektion mit *Eimeria nieschulzi* gegenüber nicht immun sind [144]. In Mäusen wurde ebenfalls gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Primärinfektion spielen, da es durch die Gabe von anti-CD4 monoklonaler Antikörper zu einer erhöhten Infektionsanfälligkeit kam [145]. Dagegen sind CD8⁺ T-Zellen für die Immunantwort der

Sekundärinfektion wichtiger, da durch die Blockierung mit Hilfe von anti-CD8 Antikörper die Resistenz gegen Neuinfektionen in Mäusen deutlich sank [103].

Die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen während einer Infektion mit *Eimerien*, wurde bereits in Mäusen untersucht. Während $\alpha\beta$ -defizitäre Mäuse keine vollständige Immunantwort in der Infektion mit *Eimeria veriformis* zeigten, wurde in Mäuse mit einem $\gamma\delta$ T-Zell KO eine starke Darmschädigung bei der Infektion mit *Eimeria veriformis* festgestellt. Daher wurde vermutet, dass $\gamma\delta$ T-Zellen vor allem für die Regulierung einer überschießenden $\alpha\beta$ T-Zell Immunantwort zuständig sind [109]. Da Mäuse allerdings nicht die natürlichen Wirte von *Eimerien* sind, wurde in dieser Arbeit die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Primär- und Sekundärinfektion mit *Eimeria tenella* mithilfe von TCR $C\gamma$ KO-Hühnern analysiert. Ausgehend von den Ergebnissen in der Maus, wurde bei der Infektion der TCR $C\gamma$ KO-Hühnern in dieser Arbeit auch angenommen, dass es zu stärkeren Darmschädigungen im Caecum kommt. Weder der Läsionsscore noch die histologische Analyse der infizierten TCR $C\gamma$ KO-Hühner zeigten eine so ausgeprägte Darmschädigung wie bei den $\gamma\delta$ T-Zell-KO-Mäusen [109] (siehe Ergebnisse 6.2.1., 6.2.3).

In Hühnern wurde ebenfalls gezeigt, dass durch die Injektion von IL17A neutralisierenden Antikörpern Shizonten eine reduzierte intrazelluläre Entwicklung zeigten und daher weniger Migration in Richtung Submukosa stattfand [146]. Sowohl $\alpha\beta$ als auch $\gamma\delta$ T-Zellen sekretieren IL-17A im Darm von Hühnern [147]. In dieser Arbeit wurde die maximale Eindringtiefe der Shizonten in die Submukosa gemessen, um zu analysieren, ob auch durch den Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen die Shizonten weniger tief in die Submukosa eindringen können. Bei der Analyse der maximalen Eindringtiefe der Shizonten im Primärinfektionsversuch konnten die Shizonten in den TCR $C\gamma$ KO-Tieren signifikant weniger tief in die Submukosa eindringen als in den WT-Kontrolltieren (siehe Ergebnisse 6.2.1). Dieser Effekt könnte auf das Fehlen von IL-17A zurückgeführt werden, welches an der Migration der Shizonten beteiligt ist [146].

Allerdings konnten keine weiteren Unterschiede zwischen TCR $C\gamma$ KO-Tieren und WT-Tieren im Läsionsscore oder der Oozytenzahl festgestellt werden (siehe Ergebnisse 6.2.1). Bei der histologischen Analyse konnte auch keine verstärkte Darmschädigung wie

Hämorrhagie, Kryptenatrophie, nekrotischer Debris oder Durchbrechung der Muskosa in TCR C γ KO-Hühnern gezeigt werden (siehe Ergebnisse 6.2.3) im Vergleich zu TCR C γ KO-Mäusen, die eine verstärkte Darmschädigung bei der Infektion mit *Eimerien* zeigten [144]. Dies liegt vermutlich an der Kompensation durch die TCR2⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen (siehe Ergebnisse 6.2.2). Um die kompensatorischen Effekte genauer zu analysieren ist es sinnvoll weitere Genexpressionsanalysen durchzuführen, um die zu Erregereliminierung gebildeten Interleukine zwischen den Genotypen zu vergleichen. Ebenfalls wäre es sinnvoll TCR C β KO-Tiere im Vergleich zu den TCR C γ KO-Tiere zu infizieren, um zu analysieren, wie die $\gamma\delta$ T-Zellen allein in der Erregerabwehr fungieren. Hierfür wäre ein induzierbarer Knockout notwendig, um die Entwicklungsprobleme der TCR C β KO -Tiere zu umgehen.

Zusammenfassend konnte bei der Infektion der TCR C γ KO-Tiere mit *Eimeria tenella*, weder ein regulatorischer Effekt der $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden, wie beispielsweise bei TCR C γ KO-Mäusen [144], noch eine Beteiligung an schweren Caecumläsionen nachgewiesen werden, die durch die T-Zell vermittelte Sekretion von IL17A entsteht [146].

7.3 Herausforderungen bei der Etablierung eines adoptiven Transfersystems im Huhn

Adoptive Transfersysteme werden bereits in Mäusen eingesetzt, um die Rolle von bestimmten Lymphozyten-Populationen während einer Infektion zu analysieren [148]. Ein Ziel dieser Arbeit war es ein adoptives Transfersystem im Huhn zu etablieren, um markierte T-Zell-Subpopulationen in T-Zell KO-Hühner zu transferieren, sodass diese Zellen verfolgt werden können, um ihre Wege und Funktionen genauer zu beschreiben.

In Hühnern ist die Etablierung eines solchen adoptiven Transfer System herausfordernd, durch das Fehlen von kommerziell erhältlichen Inzuchtstämmen. Während zwar einige Inzuchtstämme auch in Hühnern vorhanden sind, ist allerdings fraglich wie sinnvoll der Einsatz dieser in der Forschung ist, da Erkenntnisse von Inzucht-Hühnern nicht direkt auf landwirtschaftlich genutzte Hühner übertragen werden können [149]. Weiterhin in die Generierung von KO-Hühnern dieser Inzuchtstämme deutlich schwieriger. Daher mussten der MHC-Haplotyp der Hühner vor dem Transfer mittels PCR bestimmt werden, um Effekte wie Abstoßungs- oder Graft-versus-Host-Reaktionen zu verhindern [17]. Bei der Analyse der Spender- und Empfängertiere stellte sich heraus, dass die Tiere nur drei

verschiedene Haplotypen besitzen: B15, B21 und einen heterozygoten Haplotyp aus B15 und B21 [150] (siehe Ergebnisse 6.3.1). Der Vorteil hierbei ist, dass mit höherer Wahrscheinlichkeit passende Spender- und Empfänger-Tiere gefunden werden.

Die Ergebnisse des Transfers zeigten, dass es möglich war, mCherry⁺ markierte T-Zellpopulationen zu transferieren. Allerdings verblieben diese nur wenige Tage in den T-Zell KO-Tieren. Hierbei spielen die Reinheit und Anzahl der Zellen eine untergeordnete Rolle, da keine Zusammenhänge zwischen dem Auffinden der Zellen und der Reinheit, Zellzahl oder dem entsprechenden Organ, aus welchem die Zellen isoliert wurden, gefunden werden konnte. Insgesamt wurde bei der Isolierung von $\alpha\beta$ T-Zellen aus Blut eine signifikant höhere Reinheit erreicht als bei den isolierten Zellen aus Thymus und Milz. Die Präparierung von Blut war ebenfalls deutlich einfacher. Somit wurde gezeigt, dass die Isolierung von T-Zellen aus Blut effizienter ist als aus Milz oder Thymusgewebe (siehe Ergebnisse 6.3.2, 6.3.3).

Beim Transfer sowohl in TCR C γ KO-, als auch in TCR C β KO-Tiere wurden vereinzelte transferierte mCherry⁺ Zellen in den lymphatischen Organen gefunden. Durch den Transfer von mCherry⁺ Thymozyten in Hühnerembryos, konnte gezeigt werden, dass die transferierten T-Zellen aus den Venen in den Thymus einwandern. Dies wurde deutlich, indem mittels Durchflusszytometrie mCherry⁺ Zellen eine Woche nach dem Transfer sowohl im Blut wie auch im Thymus detektiert wurden (siehe Ergebnisse 6.3.4). Dadurch wird spekuliert, dass die transferierten Zellen funktional sind und für die weitere Ausdifferenzierung in den Thymus einwandern. Im nächsten Schritt sollten die erfolgreich transfizierten Embryos geschlüpft werden, um zu überprüfen, ob durch den frühen Transfer die mCherry⁺ Zellen länger im Tier verbleiben. Aufgrund der unvollständigen Ausbildung des Immunsystems im Embryo könnte es sein, dass die transferierten T-Zellen daher besser vom Organismus akzeptiert werden.

Um das Verfahren weiter zu verbessern wäre es sinnvoll frühere Zeitpunkte nach dem Transfer zu untersuchen, um zu sehen, wie viele Zellen tatsächlich transferiert werden und wann sie verschwinden. Außerdem ist es sinnvoll neben den T-Zell KO-Tieren ebenfalls zu versuchen mCherry⁺ Zellen in Wildtyp-Tiere zu transferieren. Damit wird

ausgeschlossen, dass die KO-Systeme die Zellen nicht aufnehmen können, dadurch dass die natürliche Umgebung der T-Zellen gestört ist. Außerdem könnte die positive MACS-Sortierung einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, da die Markierung mit T-Zell-Antikörpern eventuell zu einer Aktivierung der T-Zellen führt [76]. Daher ist es sinnvoll auch Gesamt-PBMCs zu transferieren. Dies hätte den zusätzlichen Nutzen, dass die Zellzahl um einiges höher wäre. Rose et al. (1982) beschreiben den Transfer von Milzzellen und PBMCs, die aus zuvor *Eimeria*-infizierten Spenderhühnern isoliert wurden. Hierbei führte bei der Infektion mit *Eimeria maxima* eine Zellzahl von 6×10^8 Milzzellen bzw. $5,5 \times 10^8$ PBMCs zu einer signifikanten Reduktion der Oozytenzahl in den Empfängertiere [112]. Im Vergleich wurden in dieser Arbeit maximal $10,725 \times 10^6$ $\gamma\delta$ T-Zellen aus PBMCs von vier Wochen alten Spenderhühnern isoliert (siehe Ergebnisse 6.3.2). Daher wäre es ebenso denkbar ältere Spendertiere zu nutzen, um die Zellzahl zu erhöhen.

Obwohl bereits durch den Transfer von zuvor geprimten PBMCs in der Infektion mit *Eimeria maxima* [112], IBV [113], hochpathogenen Influenzaviren [115] oder MDV [116], gezeigt wurde, dass die Empfängerhühner Immunität entwickeln, war es bisher nicht möglich eine isolierte T-Zell-Population zu transferieren und die transferierten Zellen in den Empfängerhühnern zu verfolgen, was ein Ziel dieser Arbeit war. Zusammenfassend können durch die hier durchgeführten adoptiven Transferexperimente noch keine Rückschlüsse über die Migration, Interaktion und Funktion der T-Zell-Subpopulationen geschlossen werden. Allerdings wurden die transferierten mCherry⁺-Zellen in den T-Zell KO-Tieren sowohl im Blut als auch in den Organen wiedergefunden. *In ovo* konnte gezeigt werden, dass die Zellen in den Thymus migrieren können. Das Verfahren muss allerdings im nächsten Schritt noch verbessert werden, sodass es bald möglich sein wird, wie in der Maus, Migrationen von transferierte T-Zellen durch ihre Fluoreszenzmarkierung zu analysieren [151].

7.4 Die Erstellung eines induzierbaren KO-Systems im Huhn

Da die TCR C β KO-Tiere einen krankhaften Phänotyp zeigten (siehe Diskussion 7.1), können diese nicht für weitere Studien eingesetzt werden, um beispielsweise die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen während der Infektion mit *Eimerien* zu analysieren (siehe Diskussion 7.2). Außerdem war auch der adoptive Transfer von mCherry⁺ Zellen in TCR C β KO-Tiere eine Woche nach dem Schlupf nicht ausreichend, um die Tiere vor den

Entzündungsreaktionen zu bewahren (siehe Diskussion 7.3). Daher wurden Cre-ER^{T2}-Chimären und eine loxP TCR C β ^{KI}- Keimzelllinie generiert, um durch die Verpaarung beider Hühnerlinien im nächsten Schritt einen induzierbaren TCR C β KO zu generieren.

Durch die Gabe von Tamoxifen wird das Cre aktiviert, sodass Cre in den Nukleus einwandern kann und die konstante Region des T-Zell-Rezeptors ausschneidet. Der induzierbare Knockout mittels Cre-ER^{T2} wurde bereits in Mäusen etabliert, um beispielsweise einen induzierbaren Knockout für regulatorische T-Zellen zu erzeugen, da der permanente Knockout des Transkriptionsfaktors FoxP3 zu nicht lebensfähigen Mäusen führt [73]. Gleichzeitig wurde in Mäusen aber auch gezeigt, dass es trotzdem zu spontaner Tamoxifen-unabhängiger Cre-Aktivität kommen kann, [152], was zur Folge hat, dass es frühzeitig zum Ausschneiden des loxP markierten Gens kommen kann, [153]. Ob die in dieser Arbeit generierten Cre-ER^{T2} Chimären eine spontane Tamoxifen-unabhängige Cre-Aktivität aufweisen, kann erst nach der Verpaarung der F1- Generationen der Cre-ER^{T2}-Hühner mit den loxP TCR C β ^{KI}-Hühnern analysiert werden.

Zuvor wurden bereits Hühner generiert, die Cre-Rekombinase exprimieren. Diese Hühner zeigten zwar eine normale Reproduktion [154], wiesen aber gesundheitliche Probleme auf (persönliche Kommunikation mit Leighton, P. (Ligand Pharmaceuticals, Emeryville, CA, USA), TARC Conference 2017). Auch in Mäusen wurde gezeigt, dass Cre-ER^{T2} toxisch ist, da es DNA-Schäden auslösen kann [155]. Daher ist noch unklar, ob die F1-Generation der Cre-ER^{T2}-Hühner einen krankhaften Phänotyp aufweisen wird.

Die geplanten TCR C β ^{CreERT2} Hühner besitzen dann einen induzierbaren Knockout, der $\alpha\beta$ T-Zellen durch die Gabe von Tamoxifen eliminiert. Allerdings müssen die Dosis und die Anzahl der Dosen noch experimentell ermittelt werden. So variiert die Dosis in Mäusen zwischen 20mg/kg und 250mg/kg, sowie die Anzahl der Dosen von einer Einmalgabe zu drei Injektionen [155]. Zudem gibt es keine Literatur über die Halbwertszeit des T-Zell-Rezeptor in Hühnern, sodass nicht klar ist, wie lange es dauert alle $\alpha\beta$ T-Zellen vollständig zu eliminieren.

Die Generierung eines induzierbaren Cre-ER^{T2}-Hühnermodells hat einige Nachteile im Vergleich zu einem permanenten Knockout: Zum einen ist die Generierung von zwei genetisch veränderten Hühnerlinien und deren Verpaarung zu einer gemeinsamen Hühnerlinie sehr zeitaufwändig. Zum anderen kann die eigentlich inaktive Cre-Rekombinase spontan ungewollte Aktivität aufweisen oder zu toxischen DNA-Schäden führen [152, 155]. Trotz der Nachteile hat der Einsatz eines induzierbaren Cre-ER^{T2}-Hühnermodells den Vorteil, dass der Knockout von spezifischen Genen zeitlich gesteuert werden kann. Zudem kann eine etablierte Cre-ER^{T2}-Hühnerlinie für viele verschiedene Versuchsmodelle eingesetzt werden [98]. Abschließend ist die Generierung eines induzierbaren TCR C β KO eine sinnvolle Lösung, um die Entwicklungsprobleme der permanenten TCR C β KO-Hühnern zu umgehen, da sich die T-Zellen und lymphatischen Organe bis zur Induktion des KOs normal entwickeln können. Für die erfolgreiche Induktion der KOs sind allerdings noch viele Parameter, wie die Tamoxifen Dosis und Injektionsintervalle, auszutesten.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die Rolle der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen im Huhn in der Infektionsabwehr ist weitestgehend unbekannt. Reverse Genetik ist eine gängige Methode, um Funktionen einzelner Lymphozyten-Populationen zu studieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es TCR C β KO-Hühner phänotypisch zu charakterisieren. Durch die Charakterisierung dieser Hühner wurde erkenntlich, dass $\alpha\beta$ T-Zellen essenziell für die Entwicklung der lymphatischen Organe wie Thymus und Bursa sind. Ebenfalls zeigten die Hühner krankhafte Entzündungen in der Milz, Haut und dem Muskelmagen, hervorgerufen durch ein Ungleichgewicht der humoralen und zytotoxischen Immunabwehr.

Um zukünftig die Rolle der $\alpha\beta$ T-Zellen während einer Infektion mit *Eimeria tenella* zu studieren, ist daher ein induzierbares TCR C β KO-System notwendig, da durch die zeitliche Steuerung des KOs zunächst eine normale Entwicklung der Hühner möglich ist. Mithilfe der in dieser Arbeit generierten Cre-ER^{T2}-Chimären und der loxP TCR C β ^{KI}-Keimzelllinie, kann nachfolgend ein solches induzierbares TCR C β KO-System erstellt werden.

Gleichzeitig stellt sich die Frage, welche Rolle die β -Kette in der Entstehung des krankhaften Phänotyps der TCR C β KO-Hühner spielt. Mithilfe eines TCR C α KO-Huhns, könnte der Unterschied zwischen der α - und der β -Kette in der Entwicklung der lymphatischen Organe im Huhn analysiert werden.

Weiterhin wurde die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen während der Infektion mit *Eimeria tenella* in dieser Arbeit studiert. Es wurde gezeigt, dass TCR2⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen den Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen kompensieren können.

Bei der Etablierung eines adoptiven Transfersystems konnte gezeigt werden, dass ein Transfer zum frühestmöglichen Zeitpunkt, die Anzahl der Zellen und die MHC-Haplotypisierung wichtig für den Erfolg des adoptiven Transfers von mCherry⁺-Zellen in TCR KO-Hühner sind. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können helfen zukünftig den adoptiven Transfer von spezifischen Zellpopulationen im Huhn zu etablieren.

9 Literaturverzeichnis

- 1 **Unmüßig, B.**, Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel *W.H. Fleischatlas 2016* 2016.
- 2 **Alexandratos, N. B. J.**, World Agriculture towards 2030/2050 2012. **12.**
- 3 **Organisation, F. a. A.**, How to feed the world in 2050 2009.
- 4 **Farrell, D.**, The role of poultry in human nutrition. *FAO Poultry Production* 2011.
- 5 **Food and Agriculture Organization of the United Nations, F. a. A. D.**, The state of the world fisheries and aquaculture 2012. 2012.
- 6 **Salter, A. M.**, The effects of meat consumption on global helth. *Revue Scientifique et Technique* 2018. **37**: 47-55.
- 7 **Bodewes, R., Bestebroer, T. M., van der Vries, E., Verhagen, J. H., Herfst, S., Koopmans, M. P., Fouchier, R. A., Pfankuche, V. M., Wohlsein, P., Siebert, U., Baumgartner, W. and Osterhaus, A. D.**, Avian Influenza A(H10N7) virus-associated mass deaths among harbor seals. *Emerg Infect Dis* 2015. **21**: 720-722.
- 8 **Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., levy, S., Hossain, M. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. T. and Ashour, H. M.**, Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms* 2020. **8.**
- 9 **Abdelwhab, E. M. and Mettenleiter, T. C.**, Zoonotic Animal Influenza Virus and Potential Mixing Vessel Hosts. *Viruses* 2023. **15.**
- 10 **Klasing, K. C.**, Nutrition and the immune system. *Br Poult Sci* 2007. **48**: 525-537.
- 11 **Cooper, M. D., Peterson, R. D. and Good, R. A.**, Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature* 1965. **205**: 143-146.
- 12 **Isaacs, A. and Lindenmann, J.**, Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 1987. **7**: 429-438.
- 13 **Cooper, M. D. and Alder, M. N.**, The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006. **124**: 815-822.
- 14 **Garcia, P., Wang, Y., Viallet, J. and Macek Jilkova, Z.**, The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. *Front Immunol* 2021. **12**: 791081.
- 15 **Bockman, D. E., Boydston, W. R. and Beezhold, D. H.**, The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Ann N Y Acad Sci* 1983. **409**: 129-144.
- 16 **Kaufman, J.**, Innate immune genes of the chicken MHC and related regions. *Immunogenetics* 2022. **74**: 167-177.
- 17 **Schat, K. A., Kaspers, B. and Kaiser, P.**, *Avian immunology*, Second edition. Edn. Elsevier : Academic Press, Amsterdam ; Boston: 2014.
- 18 **Zhang, Y., Xu, Z. and Cao, Y.**, Host Antiviral Responses against Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV): Focus on Innate Immunity. *Viruses* 2021. **13.**
- 19 **Yang, W., Liu, X. and Wang, X.**, The immune system of chicken and its response to H9N2 avian influenza virus. *Vet Q* 2023. **43**: 1-14.
- 20 **Sharma, J. M.**, Overview of the avian immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 1991. **30**: 13-17.
- 21 **Malissen, B., Ardouin, L., Lin, S. Y., Gillet, A. and Malissen, M.**, Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv Immunol* 1999. **72**: 103-148.

- 22 **Chen, C. H., Sowder, J. T., Lahti, J. M., Cihak, J., Losch, U. and Cooper, M. D.,** TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989. **86**: 2351-2355.
- 23 **Chen, C. H., Gobel, T. W., Kubota, T. and Cooper, M. D.,** T cell development in the chicken. *Poult Sci* 1994. **73**: 1012-1018.
- 24 **Coltey, M., Bucy, R. P., Chen, C. H., Cihak, J., Losch, U., Char, D., Le Douarin, N. M. and Cooper, M. D.,** 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**: 543-557.
- 25 **Arstila, T. P., Vainio, O. and Lassila, O.,** Central role of CD4+ T cells in avian immune response. *Poult Sci* 1994. **73**: 1019-1026.
- 26 **Luhtala, M.,** Chicken CD4, CD8alpha, and CD8alphaalpha T cell co-receptor molecules. *Poult Sci* 1998. **77**: 1858-1873.
- 27 **Davidson, N. J. and Boyd, R. L.,** Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel thymocyte subsets. *Int Immunol* 1992. **4**: 1175-1182.
- 28 **Smelty, P., Marchal, C., Renard, R., Sinzelle, L., Pollet, N., Dunon, D., Jaffredo, T., Sire, J. Y. and Fellah, J. S.,** Identification of the pre-T-cell receptor alpha chain in nonmammalian vertebrates challenges the structure-function of the molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010. **107**: 19991-19996.
- 29 **Pickel, J. M., McCormack, W. T., Chen, C. H., Cooper, M. D. and Thompson, C. B.,** Differential regulation of V(D)J recombination during development of avian B and T cells. *Int Immunol* 1993. **5**: 919-927.
- 30 **Fruh, S. P., Fruh, M. A., Kaufer, B. B. and Gobel, T. W.,** Unraveling the chicken T cell repertoire with enhanced genome annotation. *Front Immunol* 2024. **15**: 1359169.
- 31 **Mouset, C. M., Hobo, W., Woestenenk, R., Preijers, F., Dolstra, H. and van der Waart, A. B.,** Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A* 2019. **95**: 647-654.
- 32 **Gibson, M. S., Kaiser, P. and Fife, M.,** The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics* 2014. **66**: 427-438.
- 33 **Qu, Y., Zhao, H., Han, N., Zhou, G., Song, G., Gao, B., Tian, S., Zhang, J., Zhang, R., Meng, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, X., Wang, W., Lambert, D., Ericson, P. G., Subramanian, S., Yeung, C., Zhu, H., Jiang, Z., Li, R. and Lei, F.,** Ground tit genome reveals avian adaptation to living at high altitudes in the Tibetan plateau. *Nat Commun* 2013. **4**: 2071.
- 34 **Burkhardt, N. B., Elleder, D., Schusser, B., Krchlikova, V., Gobel, T. W., Hartle, S. and Kaspers, B.,** The Discovery of Chicken Foxp3 Demands Redefinition of Avian Regulatory T Cells. *J Immunol* 2022. **208**: 1128-1138.
- 35 **Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y.,** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003. **4**: 330-336.
- 36 **Dai, M., Xu, C., Chen, W. and Liao, M.,** Progress on chicken T cell immunity to viruses. *Cell Mol Life Sci* 2019. **76**: 2779-2788.
- 37 **Tregaskes, C. A., Kong, F. K., Paramithiotis, E., Chen, C. L., Ratcliffe, M. J., Davison, T. F. and Young, J. R.,** 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**: 4485-4494.
- 38 **Luhtala, M., Lassila, O., Toivanen, P. and Vainio, O.**, A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1997. **27**: 189-193.
- 39 **Parel, Y. and Chizzolini, C.**, CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev* 2004. **3**: 215-220.
- 40 **Naghizadeh, M., Hatamzade, N., Larsen, F. T., Kjaerup, R. B., Wattring, E. and Dalgaard, T. S.**, Kinetics of activation marker expression after in vitro polyclonal stimulation of chicken peripheral T cells. *Cytometry A* 2022. **101**: 45-56.
- 41 **Sowder, J. T., Chen, C. L., Ager, L. L., Chan, M. M. and Cooper, M. D.**, A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 1988. **167**: 315-322.
- 42 **Mackay, C. R. and Hein, W. R.**, 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**: 540-545.
- 43 **Piriou-Guzylack, L. and Salmon, H.**, Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet Res* 2008. **39**: 54.
- 44 **Caro, M. R., Gallego, M. C., Buendia, A. J., Navarro, E. and Navarro, J. A.**, Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. *Res Vet Sci* 1998. **65**: 145-148.
- 45 **Hayday, A. C., Roberts, S. and Ramsburg, E.**, gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2000. **162**: S161-163.
- 46 **Holderness, J., Hedges, J. F., Ramstead, A. and Jutila, M. A.**, Comparative biology of gammadelta T cell function in humans, mice, and domestic animals. *Annu Rev Anim Biosci* 2013. **1**: 99-124.
- 47 **Berndt, A. and 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**: 143-161.
- 48 **Lillehoj, H. S.**, Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Res Vet Sci* 1994. **56**: 1-7.
- 49 **Berndt, A., Pieper, J. and Methner, U.**, Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. *Infect Immun* 2006. **74**: 3967-3978.
- 50 **Fenzl, L., Gobel, T. W. and Neulen, M. L.**, gammadelta T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken. *Dev Comp Immunol* 2017. **73**: 175-183.
- 51 **Tsuji, S., Char, D., Bucy, R. P., Simonsen, M., Chen, C. H. and Cooper, M. D.**, 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**: 420-427.
- 52 **Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W. L. and Boismenu, R.**, Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 14338-14343.
- 53 **Sandrock, I., Reinhardt, A., Ravens, S., Binz, C., Wilharm, A., Martins, J., Oberdorfer, L., Tan, L., Lienenklaus, S., Zhang, B., Naumann, R., Zhuang, Y., Krueger, A., Forster, R. and Prinz, I.**, Genetic models reveal origin, persistence

- and non-redundant functions of IL-17-producing gammadelta T cells. *J Exp Med* 2018. **215**: 3006-3018.
- 54 **Dong, P., Ju, X., Yan, Y., Zhang, S., Cai, M., Wang, H., Chen, H., Hu, Y., Cui, L., Zhang, J. and He, W.**, gammadelta T Cells Provide Protective Function in Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza A Virus Infection. *Front Immunol* 2018. **9**: 2812.
- 55 **Kendall, M. D.**, Avian thymus glands: a review. *Dev Comp Immunol* 1980. **4**: 191-209.
- 56 **Nagy, N. and Olah, I.**, Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development* 2010. **137**: 3019-3023.
- 57 **John, J. L.**, The avian spleen: a neglected organ. *Q Rev Biol* 1994. **69**: 327-351.
- 58 **Jeurissen, S. H.**, Structure and function of the chicken spleen. *Res Immunol* 1991. **142**: 352-355.
- 59 **Olah, I., Kupper, A. and Kittner, Z.**, The lymphoid substance of the chicken's harderian gland is organized in two histologically distinct compartments. *Microsc Res Tech* 1996. **34**: 166-176.
- 60 **Kogut, M. H., Lee, A. and Santin, E.**, Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult Sci* 2020. **99**: 1906-1913.
- 61 **Olah, I. and Glick, B.**, Meckel's diverticulum. I. Extramedullary myelopoiesis in the yolk sac of hatched chickens (*Gallus domesticus*). *Anat Rec* 1984. **208**: 243-252.
- 62 **Burns, R. B.**, Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 1982. **32**: 359-367.
- 63 **Ciriaco, E., Pinera, P. P., Diaz-Esnal, B. and Laura, R.**, Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc Res Tech* 2003. **62**: 482-487.
- 64 **Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. and Kyewski, B.**, Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009. **9**: 833-844.
- 65 **Bodi, I., Minko, K., Molnar, D., Nagy, N. and Olah, I.**, A novel aspect of the structure of the avian thymic medulla. *Cell Tissue Res* 2015. **359**: 489-501.
- 66 **Olah, I. and Glick, B.**, Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. *Am J Anat* 1982. **165**: 445-480.
- 67 **Jeurissen, S. H. and Janse, E. M.**, Germinal centers develop at predilected sites in the chicken spleen. *Adv Exp Med Biol* 1994. **355**: 237-241.
- 68 **Ratcliffe, M. J.**, Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev Comp Immunol* 2006. **30**: 101-118.
- 69 **Kim, I. J., You, S. K., Kim, H., Yeh, H. Y. and Sharma, J. M.**, Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *J Virol* 2000. **74**: 8884-8892.
- 70 **Gobel, T. W., Kaspers, B. and Stangassinger, M.**, NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 2001. **13**: 757-762.
- 71 **Dianda, L., Hanby, A. M., Wright, N. A., Sebesteny, A., Hayday, A. C. and Owen, M. J.**, T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* 1997. **150**: 91-97.

- 72 **Dianda, L., Gulbranson-Judge, A., Pao, W., Hayday, A. C., MacLennan, I. C. and Owen, M. J.**, Germinal center formation in mice lacking alpha beta T cells. *Eur J Immunol* 1996. **26**: 1603-1607.
- 73 **Tai, Y., Sakamoto, K., Takano, A., Haga, K. and Harada, Y.**, Dysregulation of humoral immunity in Foxp3 conditional-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2019. **513**: 787-793.
- 74 **Kasprowicz, D. J., Smallwood, P. S., Tyznik, A. J. and Ziegler, S. F.**, Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol* 2003. **171**: 1216-1223.
- 75 **Sato, Y., Nathan, A., Shipp, S., Wright, J. F., Tate, K. M., Wani, P., Roncarolo, M. G. and Bacchetta, R.**, A novel FOXP3 knockout-humanized mouse model for pre-clinical safety and efficacy evaluation of Treg-like cell products. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2023. **31**: 101150.
- 76 **Cihak, J., Losch, U., Hoffmann-Fezer, G., Chen, C. H., Cooper, M. D. and Ziegler-Heitbrock, H. W.**, In vivo depletion of chicken T-cell subsets. *Scand J Immunol* 1993. **38**: 123-129.
- 77 **Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T.**, Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003. **69**: 612-616.
- 78 **van de Lavoie, M. C., Diamond, J. H., Leighton, P. A., Mather-Love, C., Heyer, B. S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L. T., Gessaro, T. M., Swanberg, S. E., Delany, M. E. and Etches, R. J.**, Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 2006. **441**: 766-769.
- 79 **Salter, D. W., Smith, E. J., Hughes, S. H., Wright, S. E. and Crittenden, L. B.**, Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology* 1987. **157**: 236-240.
- 80 **Love, J., Gribbin, C., Mather, C. and Sang, H.**, Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology (N Y)* 1994. **12**: 60-63.
- 81 **McGrew, M. J., Sherman, A., Ellard, F. M., Lillico, S. G., Gilhooley, H. J., Kingsman, A. J., Mitrophanous, K. A. and Sang, H.**, Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2004. **5**: 728-733.
- 82 **Smith, C. A., Roeszler, K. N. and Sinclair, A. H.**, Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation* 2009. **77**: 473-482.
- 83 **Schusser, B., Collarini, E. J., Yi, H., Izquierdo, S. M., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K. C., Kaspers, B., Harriman, W. D., van de Lavoie, M. C., Etches, R. J. and Leighton, P. A.**, Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013. **110**: 20170-20175.
- 84 **Han, J. Y. and Lee, B. R.**, Isolation and Characterization of Chicken Primordial Germ Cells and Their Application in Transgenesis. *Methods Mol Biol* 2017. **1650**: 229-242.
- 85 **Lee, H. J., Lee, H. C. and Han, J. Y.**, Germline Modification and Engineering in Avian Species. *Mol Cells* 2015. **38**: 743-749.
- 86 **Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P. and McGrew, M. J.**, FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports* 2015. **5**: 1171-1182.

- 87 **Kheimar, A., Klinger, R., Bertzbach, L. D., Sid, H., Yu, Y., Conradie, A. M., Schade, B., Bohm, B., Preisinger, R., Nair, V., Kaufer, B. B. and Schusser, B.,** A Genetically Engineered Commercial Chicken Line Is Resistant to Highly Pathogenic Avian Leukosis Virus Subgroup J. *Microorganisms* 2021. **9**.
- 88 **Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E.,** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012. **337**: 816-821.
- 89 **Waters, C. A., Strande, N. T., Pryor, J. M., Strom, C. N., Mieczkowski, P., Burkhalter, M. D., Oh, S., Qaqish, B. F., Moore, D. T., Hendrickson, E. A. and Ramsden, D. A.,** The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining. *Nat Commun* 2014. **5**: 4286.
- 90 **Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. and Aguilera, A.,** DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 2009. **66**: 1039-1056.
- 91 **von Heyl, T., Klinger, R., Aumann, D., Zenner, C., Alhussien, M., Schlickerrieder, A., Lengyel, K., Vikkula, H. K., Mittermair, T., Sid, H. and Schusser, B.,** Loss of alphabeta but not gammadelta T cells in chickens causes a severe phenotype. *Eur J Immunol* 2023. **53**: e2350503.
- 92 **Trefil, P., Aumann, D., Koslova, A., Mucksova, J., Benesova, B., Kalina, J., Wurmser, C., Fries, R., Elleder, D., Schusser, B. and Hejnar, J.,** Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken. *Sci Rep* 2017. **7**: 14246.
- 93 **Glover, J. D., Taylor, L., Sherman, A., Zeiger-Poli, C., Sang, H. M. and McGrew, M. J.,** A novel piggyBac transposon inducible expression system identifies a role for AKT signalling in primordial germ cell migration. *PLoS One* 2013. **8**: e77222.
- 94 **Feil, S., Valtcheva, N. and Feil, R.,** Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol* 2009. **530**: 343-363.
- 95 **Hoess, R. H. and Abremski, K.,** Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984. **81**: 1026-1029.
- 96 **Albert, H., Dale, E. C., Lee, E. and Ow, D. W.,** Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J* 1995. **7**: 649-659.
- 97 **Baron, R. M., Choi, A. J., Owen, C. A. and Choi, A. M.,** Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012. **302**: L485-497.
- 98 **Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P. and Metzger, D.,** Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 1999. **27**: 4324-4327.
- 99 **Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. and Chambon, P.,** Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. **237**: 752-757.
- 100 **Risteovski, S.,** Making better transgenic models: conditional, temporal, and spatial approaches. *Mol Biotechnol* 2005. **29**: 153-163.

- 101 **Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitso, K., Madden, B., McCormick, D. J. and Toft, D. O.**, Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol* 1993. **13**: 869-876.
- 102 **Walrath, J. C., Hawes, J. J., Van Dyke, T. and Reilly, K. M.**, Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv Cancer Res* 2010. **106**: 113-164.
- 103 **Soutter, F., Werling, D., Tomley, F. M. and Blake, D. P.**, Poultry Coccidiosis: Design and Interpretation of Vaccine Studies. *Front Vet Sci* 2020. **7**: 101.
- 104 **Abdul-Aziz T., F. O. J., Barnes H.J.**, Avian Histopathology. *The American Association of Avian Pathologists* 2016. **4th Edition**: 664.
- 105 **Lang, M., Kann, M., Zahner, H., Taubert, A. and Hermosilla, C.**, Inhibition of host cell apoptosis by *Eimeria bovis* sporozoites. *Vet Parasitol* 2009. **160**: 25-33.
- 106 **Lopez-Osorio, S., Chaparro-Gutierrez, J. J. and Gomez-Osorio, L. M.**, Overview of Poultry *Eimeria* Life Cycle and Host-Parasite Interactions. *Front Vet Sci* 2020. **7**: 384.
- 107 **Swayne, D. E.**, Diseases in poultry. *Wiley-Blackwell* 2013. **13**.
- 108 **Kim, W. H., Chaudhari, A. A. and Lillehoj, H. S.**, Involvement of T Cell Immunity in Avian Coccidiosis. *Front Immunol* 2019. **10**: 2732.
- 109 **Roberts, S. J., Smith, A. L., West, A. B., Wen, L., Findly, R. C., Owen, M. J. and Hayday, A. C.**, T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 11774-11779.
- 110 **Smith, A. L. and Hayday, A. C.**, An alphabeta T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by gammadelta cells. *Immunology* 2000. **101**: 325-332.
- 111 **Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. and Dudley, M. E.**, Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008. **8**: 299-308.
- 112 **Rose, M. E. and Hesketh, P.**, Immunity to coccidia in chickens: adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. *Parasite Immunol* 1982. **4**: 171-185.
- 113 **Seo, S. H., Pei, J., Briles, W. E., Dzielawa, J. and Collisson, E. W.**, Adoptive transfer of infectious bronchitis virus primed alphabeta T cells bearing CD8 antigen protects chicks from acute infection. *Virology* 2000. **269**: 183-189.
- 114 **Lapidou, M., Schlickerrieder, A., Thoma, T., Lengyel, K. and Schusser, B.**, Blocking of the CXCR4-CXCL12 Interaction Inhibits the Migration of Chicken B Cells Into the Bursa of Fabricius. *Front Immunol* 2019. **10**: 3057.
- 115 **Schmiedeke, J. K., Hoffmann, D., Hoffmann, B., Beer, M. and Blohm, U.**, Establishment of Adequate Functional Cellular Immune Response in Chicks Is Age Dependent. *Avian Dis* 2020. **64**: 69-79.
- 116 **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. and Sharif, S.**, Activated Chicken Gamma Delta T Cells Are Involved in Protective Immunity against Marek's Disease. *Viruses* 2023. **15**.
- 117 **Guillemot, F., Kaufman, J. F., Skjoedt, K. and Auffray, C.**, The major histocompatibility complex in the chicken. *Trends Genet* 1989. **5**: 300-304.
- 118 **Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Alvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noe, F. and Freund, C.**, Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and

- MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 2017. **8**: 292.
- 119 **Kaufman, J. and Wallny, H. J.**, Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996. **212**: 129-141.
- 120 **Bertzbach, L. D., Tregaskes, C. A., Martin, R. J., Deumer, U. S., Huynh, L., Kheimar, A. M., Conradie, A. M., Trimpert, J., Kaufman, J. and Kaufer, B. B.**, The Diverse Major Histocompatibility Complex Haplotypes of a Common Commercial Chicken Line and Their Effect on Marek's Disease Virus Pathogenesis and Tumorigenesis. *Front Immunol* 2022. **13**: 908305.
- 121 **Liu, H., Zhang, M., Han, H., Yuan, J. and Li, Z.**, Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Virology* 2010. **7**: 364.
- 122 **Khampeerathuch, T. M., Acharaporn; Srikok, Suphakit; Vannamahaxay, Soulasack; Chotinun, Suwit; Chuammitri, Phongsakorn**, Differential gene expression in heterophils isolated from commercial hybrid and Thai indigenous broiler chickens under quercetin supplementation. *Journal of Applied Animal Research* 2018. **46**: 804–812.
- 123 **Kim, S., Faris, L., Cox, C. M., Sumners, L. H., Jenkins, M. C., Fetterer, R. H., Miska, K. B. and Dalloul, R. A.**, Molecular characterization and immunological roles of avian IL-22 and its soluble receptor IL-22 binding protein. *Cytokine* 2012. **60**: 815-827.
- 124 **Yu, H., Zou, W., Mi, C., Wang, Q., Dai, G., Zhang, T., Zhang, G., Xie, K., Wang, J. and Shi, H.**, Research Note: Expression of T cell-related cytokines in chicken cecal and spleen tissues following *Eimeria tenella* infection in vivo. *Poult Sci* 2021. **100**: 101161.
- 125 **Xu, F., Liu, S. and Li, S.**, Effects of selenium and cadmium on changes in the gene expression of immune cytokines in chicken splenic lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 2015. **165**: 214-221.
- 126 **Breithaupt, U.**, Genexpressionsanalysen der frühen angeborenen Immunantwort des Haushuhns induziert durch eine Infektion mit *Salmonella enteritidis* mit Hilfe der Microarray Technologie. 2011.
- 127 **Brisbin, J. T., Gong, J., Parvizi, P. and Sharif, S.**, Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clin Vaccine Immunol* 2010. **17**: 1337-1343.
- 128 **Farag, M. R., Khalil, S. R., Zagloul, A. W., Hendam, B. M., Moustafa, A. A., Cocco, R., Di Cerbo, A. and Alagawany, M.**, Thiachlopid Induced Developmental Neurotoxicity via ROS-Oxidative Injury and Inflammation in Chicken Embryo: The Possible Attenuating Role of Chicoric and Rosmarinic Acids. *Biology (Basel)* 2021. **10**.
- 129 **Johnson, J. and Reid, W. M.**, Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol* 1970. **28**: 30-36.
- 130 **Cihak, J., Hoffmann-Fezer, G., Ziegler-Heibroch, H. W., Stein, H., Kaspers, B., Chen, C. H., Cooper, M. D. and Losch, U.**, T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. **88**: 10951-10955.
- 131 **Lee, K. Y., Choi, H. J., Park, K. J., Woo, S. J., Kim, Y. M. and Han, J. Y.**, Development and characterization of a CRISPR/Cas9-mediated. *Front Immunol* 2022. **13**: 892476.

- 132 **Lakhotia, A., Varadarajulu, R. and Kumar, K.,** Anaerobic Infections and Endocrinology. In **Feingold, K. R., Anawalt, B., Blackman, M. R., Boyce, A., Chrousos, G., Corpas, E., de Herder, W. W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Kapoor, N., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C. S., Kuohung, W., Laferrere, B., Levy, M., McGee, E. A., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Shah, A. S., Singer, F., Sperling, M. A., Stratakis, C. A., Trencce, D. L. and Wilson, D. P. (Eds.)** *Endotext*, South Dartmouth (MA) 2000.
- 133 **Mason, A. S., Lund, A. R., Hocking, P. M., Fulton, J. E. and Burt, D. W.,** Identification and characterisation of endogenous Avian Leukosis Virus subgroup E (ALVE) insertions in chicken whole genome sequencing data. *Mob DNA* 2020. **11**: 22.
- 134 **Seliger, C., Schaerer, B., Kohn, M., Pendl, H., Weigend, S., Kaspers, B. and Hartle, S.,** A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 2012. **145**: 86-99.
- 135 **Kaiser, P., Rothwell, L., Avery, S. and Balu, S.,** Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004. **28**: 375-394.
- 136 **Pappa, G., Sgouros, D., Theodoropoulos, K., Kanelleas, A., Bozi, E., Gregoriou, S., Krasagakis, K. and Katoulis, A. C.,** The IL-4/-13 Axis and Its Blocking in the Treatment of Atopic Dermatitis. *J Clin Med* 2022. **11**.
- 137 **Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. and Forsthuber, T. G.,** T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015. **74**: 5-17.
- 138 **Hirano, T.,** IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* 2021. **33**: 127-148.
- 139 **Vantourout, P. and Hayday, A.,** Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013. **13**: 88-100.
- 140 **Parker, M. E. and Ciofani, M.,** Regulation of gammadelta T Cell Effector Diversification in the Thymus. *Front Immunol* 2020. **11**: 42.
- 141 **Hiroyasu, S., Zeglinski, M. R., Zhao, H., Pawluk, M. A., Turner, C. T., Kasprick, A., Tateishi, C., Nishie, W., Burleigh, A., Lennox, P. A., Van Laeken, N., Carr, N. J., Petersen, F., Crawford, R. I., Shimizu, H., Tsuruta, D., Ludwig, R. J. and Granville, D. J.,** Granzyme B inhibition reduces disease severity in autoimmune blistering diseases. *Nat Commun* 2021. **12**: 302.
- 142 **Bucy, R. P., Chen, C. L., Cihak, J., Losch, U. and Cooper, M. D.,** Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* 1988. **141**: 2200-2205.
- 143 **Long, P. L. and Pierce, A. E.,** Role of Cellular Factors in the Mediation of Immunity to Avian Coccidiosis (*Eimeria Tenella*). *Nature* 1963. **200**: 426-427.
- 144 **Rose, M. E. and Hesketh, P.,** Immunity to coccidiosis: T-lymphocyte- or B-lymphocyte-deficient animals. *Infect Immun* 1979. **26**: 630-637.
- 145 **Rose, M. E., Hesketh, P. and Wakelin, D.,** Immune control of murine coccidiosis: CD4+ and CD8+ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections. *Parasitology* 1992. **105 (Pt 3)**: 349-354.
- 146 **Del Cacho, E., Gallego, M., Lillehoj, H. S., Quilez, J., Lillehoj, E. P., Ramo, A. and Sanchez-Acedo, C.,** IL-17A regulates *Eimeria tenella* schizont maturation and migration in avian coccidiosis. *Vet Res* 2014. **45**: 25.

- 147 **Walliser, I. and Gobel, T. W.**, Chicken IL-17A is expressed in alphabeta and gammadelta T cell subsets and binds to a receptor present on macrophages, and T cells. *Dev Comp Immunol* 2018. **81**: 44-53.
- 148 **Wiszniewsky, A., Layland, L. E., Arndts, K., Wadephul, L. M., Tamadaho, R. S. E., Borrero-Wolff, D., Chunda, V. C., Kien, C. A., Hoerauf, A., Wanji, S. and Ritter, M.**, Adoptive Transfer of Immune Cells Into RAG2IL-2Rgamma-Deficient Mice During *Litomosoides sigmodontis* Infection: A Novel Approach to Investigate Filarial-Specific Immune Responses. *Front Immunol* 2021. **12**: 777860.
- 149 **Stone, H. S.**, Use of Highly Inbred Chickens in Research. *Regional Poultry Laboratory Agricultural Research Service* 1975.
- 150 **Afrache, H., Tregaskes, C. A. and Kaufman, J.**, A potential nomenclature for the Immuno Polymorphism Database (IPD) of chicken MHC genes: progress and problems. *Immunogenetics* 2020. **72**: 9-24.
- 151 **Lau, D., Garcon, F., Chandra, A., Lechermann, L. M., Aloj, L., Chilvers, E. R., Corrie, P. G., Okkenhaug, K. and Gallagher, F. A.**, Intravital Imaging of Adoptive T-Cell Morphology, Mobility and Trafficking Following Immune Checkpoint Inhibition in a Mouse Melanoma Model. *Front Immunol* 2020. **11**: 1514.
- 152 **Kristianto, J., Johnson, M. G., Zastrow, R. K., Radcliff, A. B. and Blank, R. D.**, Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 in vivo. *Transgenic Res* 2017. **26**: 411-417.
- 153 **Sandlesh, P., Juang, T., Safina, A., Higgins, M. J. and Gurova, K. V.**, Uncovering the fine print of the CreERT2-LoxP system while generating a conditional knockout mouse model of *Ssrp1* gene. *PLoS One* 2018. **13**: e0199785.
- 154 **Leighton, P. A., Pedersen, D., Ching, K., Collarini, E. J., Izquierdo, S., Jacob, R. and van de Lavoie, M. C.**, Generation of chickens expressing Cre recombinase. *Transgenic Res* 2016. **25**: 609-616.
- 155 **Rashbrook, V. S., Brash, J. T. and Ruhrberg, C.**, Cre toxicity in mouse models of cardiovascular physiology and disease. *Nat Cardiovasc Res* 2022. **1**: 806-816.

10 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STRUKTURELLER AUFBAU DES T-ZELL-REZEPTORS.....	4
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TCR-LOCI DES HUHNS.	5
ABBILDUNG 3: BEKANNTE INTERLEUKINE DER CD4 ⁺ T-HELPERZELLEN IM HÜHNERGENOM SCHEMATISCH DARGESTELLT BASIEREND AUF DEM SCHEMA VON SÄUGETIEREN.....	6
ABBILDUNG 4: AUFBAU DES THYMUS.	9
ABBILDUNG 5: AUFBAU DER MILZ.....	10
ABBILDUNG 6: AUFBAU DER BURSA FABRICII	11
ABBILDUNG 7: GENERIERUNG VON GENETISCH MODIFIZIERTEN HÜHNERN DURCH DIE INJEKTION VON MODIFIZIERTEN PGCS.	13
ABBILDUNG 8: TCR C β KNOCKOUT-STRATEGIE.	14
ABBILDUNG 9: PHÄNOTYP DER MCHERRY ⁺ -HÜHNER.....	15
ABBILDUNG 10: ORT DER VERMEHRUNG DER EIMERIA SPEZIES.	17
ABBILDUNG 11: LEBENSZYKLUS VON EIMERIEN.	18
ABBILDUNG 12: DER B-LOCUS IM HÜHNERGENOM.	20
ABBILDUNG 13: GATING-STRATEGIE FÜR DAS IMMUNOPHENOTYPING.	70
ABBILDUNG 14: GATING-STRATEGIE ZUR BESTIMMUNG DER T-ZELL AKTIVIERUNGSMARKER CD25, MHC II, CD28 UND CD57.....	71
ABBILDUNG 15: GATING-STRATEGIE FÜR DIE PERFORIN-UND GRANZYM B-FÄRBUNG.	72
ABBILDUNG 16: GATING-STRATEGIE FÜR A) DIE REINHEIT DER MCHERRY ⁺ ZELLEN NACH DEM MACS UND B) BESTIMMUNG DER MCHERRY ⁺ ZELLEN NACH ADOPTIVEN TRANSFER IN KO-TIERE.	72
ABBILDUNG 17: BESTIMMUNG DER MAXIMALEN SHIZONTEN-INVASIONSTIEFE.	76
ABBILDUNG 18: SCORING SYSTEM FÜR LÄSIONEN	77
ABBILDUNG 19: MARKIERUNG EINER GEEIGNETEN STELLE ZUR ALLANTOIS ENTNAHME EINES ED10 EMBRYOS ZUR IN OVO GENOTYPISIERUNG.	89
ABBILDUNG 20: DARSTELLUNG EINER GEEIGNETEN VENE EINES ED12 EMBRYOS ZUR IN OVO BLUTABNAHME BEZIEHUNGSWEISE INJEKTION.....	90
ABBILDUNG 21: EXPERIMENTELLER ABLAUF DES ADOPTIVEN TRANSFER IN TCR C γ KO.....	91
ABBILDUNG 22: EXPERIMENTELLER AUFBAU DES ADOPTIVEN TRANSFER IN TCR C β KO.....	92
ABBILDUNG 23: EXPERIMENTELLER ABLAUF DES IN OVO ADOPTIVEN TRANSFERS IN TCR C β KO- EMBRYOS.....	93
ABBILDUNG 24: EXPERIMENTELLER AUFBAU DER PRIMÄRINFEKTION MIT EIMERIA TENELLA	94
ABBILDUNG 25: EXPERIMENTELLER ABLAUF DES CHALLENGE EXPERIMENTS MIT EIMERIA TENELLA	94
ABBILDUNG 26: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BINDUNGSSTELLEN DER PRIMER FÜR EINE GENOTYPISIERUNGS-PCR.	95
ABBILDUNG 27: GENOTYPISIERUNGS-PCR ZUR UNTERSCHIEDUNG VON WILDTYP-, TCR C β ^{+/-} -UND TCR C β ^{-/-} -HÜHNERN.	96
ABBILDUNG 28: ORGAN-KÖRPERGEWICHT-QUOTIENT VON THYMUS, MILZ UND BURSA AN ED18.	97
ABBILDUNG 29: HISTOLOGISCHE ANALYSE VON TCR CB KO-HÜHNERN.	98
ABBILDUNG 30: ÄUßERES ERSCHEINUNGSBILD DER TCR C β KO-TIERE VIERZEHN TAGE NACH DEM SCHLUPF ZEIGT EINEN AUSGEPRÄGTEN PHÄNOTYP.	99
ABBILDUNG 31: GEWICHTSKURVE DER TCR C β KO-TIERE IM VERGLEICH ZU WILDTYP-HÜHNERN.	100
ABBILDUNG 32: ORGAN-KÖRPERGEWICHT-QUOTIENT VON MILZ UND BURSA DER TCR C β KO-HÜHNER IM VERGLEICH ZU WT-TIEREN	100
ABBILDUNG 33: BESTÄTIGUNG DES KNOCKOUTS VIA DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	101
ABBILDUNG 34: IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG VON TCR CB ^{-/-} -UND WT-TIEREN	103
ABBILDUNG 35: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER LYMPHATISCHEN ORGANE VON TCR C β ^{-/-}	104
ABBILDUNG 36: HISTOLOGISCHE ANALYSE VON TCR CB ^{-/-} -HÜHNERN.	105
ABBILDUNG 37: SCHNITTE AUS DER MILZ VON VIERZEHN TAGE ALTEN WILDTYP- UND TCR C β KO- HÜHNERN	106
ABBILDUNG 38: HISTOLOGISCHE ANALYSE DES PROVENTRIKULUS VON TCR CB KO-HÜHNERN IM VERGLEICH ZU WILDTYP-TIEREN.....	107

ABBILDUNG 39: BLUTPLASMA VON IGM (1:100; LOG3), IGY(1:100; LOG3) UND IGA (1:10; LOG3).....	108
ABBILDUNG 40: PRO-INFLAMMATORISCHE GENEXPRESSIONEN VON TCR C β KO-UND TCR C γ KO-TIEREN IM VERGLEICH ZU WT-HÜHNERN	109
ABBILDUNG 41: ANTIINFLAMMATORISCHE GENEXPRESSIONSANALYSE VON TCR C β KO-UND TCR C γ KO-TIEREN IM VERGLEICH ZU WT-HÜHNERN	110
ABBILDUNG 42: FOXP3-EXPRESSION VON TCR C β KO- UND TCR C γ KO-TIEREN IM VERGLEICH ZU WT-HÜHNERN	110
ABBILDUNG 43: MESSUNG DER T-ZELLAKTIVIERUNGSMARKER VON A) MHCII (2G11), B) CD25 (AV20) C) CD28 (AV7) UND D) CD57 (NK-1).	111
ABBILDUNG 44: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG VON A) PERFORIN-FITC (F-1) UND B) GRANZYM B-PE (3G8.5)	112
ABBILDUNG 45: ANPAARUNGSSTRATEGIE DES TCR-DOPPEL-KOS VON TCR C β UND TCR C γ KO-TIEREN.	113
ABBILDUNG 46: HISTOLOGISCHE ANALYSE DES A) THYMUS, B) MILZ, C) BURSA UND D) MUSKELMAGENS	114
ABBILDUNG 47: GEWICHTSKURVE VON TCR C β + γ KO-HÜHNER (N=3) IM VERGLEICH ZU TCR C γ KO-(N=7) UND WT-HÜHNER (N=5).	114
ABBILDUNG 48: IMMUNOPHÄNOTYPISIERUNG DES TCR C β + γ KO-HUHNS IM VERGLEICH ZU TCR C γ KO-UND WILDYTP-HÜHNERN.	115
ABBILDUNG 49: GEWICHTSKURVEN VON A) PRIMÄRINFEKTIONSVERSUCH DER TCR C γ KO-TIERE IM VERGLEICH ZU WILDYTP-TIEREN	117
ABBILDUNG 50: A) LÄSIONSSCORE UND B) OOZYTEN IM CAECAL INHALT VON PRIMÄR- UND CHALLENGEEXPERIMENT.	118
ABBILDUNG 51: MAXIMALE SHIZONTEN-INVASIONSTIEFE.	119
ABBILDUNG 52: RELATIVE FREQUENZ VON A) $\alpha\beta$ T-ZELLEN (TCR2 ⁺), B) $\alpha\beta$ T-ZELLEN (TCR3 ⁺), C) MAKROPHAGEN (KUL01) IM PRIMÄRINFEKTIONSEXPERIMENT	121
ABBILDUNG 53: RELATIVE FREQUENZ VON A) $\alpha\beta$ T-ZELLEN (TCR2 ⁺), B) $\alpha\beta$ T-ZELLEN (TCR3 ⁺), C) MAKROPHAGEN (KUL01), D) B-ZELLEN IM CHALLENGE-EXPERIMENT	122
ABBILDUNG 54: RELATIVE FREQUENZ DER CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, DOPPELNEGATIVEN-SUBPOPULATIONEN IN A) TCR2 ⁺ -ZELLEN UND B) TCR 3 ⁺ ZELLEN DER $\alpha\beta$ T-ZELLEN	123
ABBILDUNG 55: LÄSIONSSCORING ZUR BEWERTUNG VON A) HÄMORRHAGIE, B) KRYPTEN ATROPHIE, C) NEKROTISCHEM DEBRIS UND D) DER DURCHBRECHUNG DER MUKOSA.	124
ABBILDUNG 56: MICROSATELITE MHC-HAPLOTYPISIERUNG VON A) EMPFÄNGER-TCR C γ KO-HÜHNERN UND B) MCHERRY ⁺ SPENDERHÜHNERN.....	125
ABBILDUNG 57: MHC-HAPLOTYPISIERUNG VON TCR C γ KO-UND MCHERRY ⁺ -HÜHNERN FÜR A) B9 MIT PRIMERPAAR 1378+1379, B) B15 MIT PRIMERPAAR 1382+1383, C) B21 MIT PRIMERPAAR 1384+1385 UND D) B43 HAPLOTYPEN MIT PRIMERPAAR 1386+1387.....	127
ABBILDUNG 58: GEWICHTSVERLAUF ADOPTIVER TRANSFER VON MCHERRY ⁺ $\gamma\delta$ T-ZELLEN IN TCR C γ KO-HÜHNER.....	128
ABBILDUNG 59: REPRÄSENTATIVE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DOTPLOTS VON PBMCS DER GRUPPEN VON TCR C γ ^{-/-} -TIEREN MIT GERINGER DOSIS, MITTLERE DOSIS UND HOHE DOSIS TRANSFERIERTER ZELLEN.....	129
ABBILDUNG 60: REPRÄSENTATIVE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DOTPLOTS DER MILZ UND THYMUS NACH TAG 11 UND 35 VON DEN GRUPPEN DER TCR C γ ^{-/-} -TIEREN MIT GERINGER DOSIS, MITTLERE DOSIS UND HOHE DOSIS TRANSFERIERTER ZELLEN	130
ABBILDUNG 61: A) REINHEIT UND B) ZELLZAHL TRANSFERIERTER MCHERRY ⁺ - $\alpha\beta$ T-ZELLEN AUS THYMUS, MILZ UND BLUT VON MCHERRY ⁺ -SPENDERTIEREN.	132
ABBILDUNG 62: GEWICHTSVERLAUF ADOPTIVER TRANSFER VON MCHERRY ⁺ $\alpha\beta$ T-ZELLEN IN TCR C β KO-HÜHNER.	132
ABBILDUNG 63: REPRÄSENTATIVE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DOTPLOTS VON PBMCS DER GRUPPEN TCR C β ^{-/-} -HÜHNER MIT TRANSFERIERTEN ZELLEN AUS THYMUS (N \geq 1), MILZ (N \geq 3) UND PBMCS (N \geq 3).....	133
ABBILDUNG 64: REPRÄSENTATIVE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DOTPLOTS VON THYMUS UND MILZ DER GRUPPEN TCR C β ^{-/-} - HÜHNER MIT TRANSFERIERTEN ZELLEN AUS THYMUS (N \geq 1), MILZ (N \geq 3) UND PBMCS (N \geq 3).....	134
ABBILDUNG 65: REPRÄSENTATIVE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DOTPLOTS VON PBMCS UND THYMUS VON TCR C β ^{-/-} -EMBRYOS.	135

ABBILDUNG 66: A) GENOTYPISIERUNG UND B) GESCHLECHTSBESTIMMUNG DER CRE-ER ^{T2} -PGC-KLONE.	136
ABBILDUNG 67: DDPCR ZUR BESTIMMUNG DER INTEGRIERTEN KOPIEN DER CRE ER ^{T2} -KLONE 1-3 IM VERGLEICH ZU WT-TIEREN.....	137
ABBILDUNG 68: GESCHLECHTSBESTIMMUNG DER GESCHLÜPFTEN CHIMÄREN VON A) KLON 2 UND 3 UND B) KLON 1.....	138
ABBILDUNG 69: ÜBERPRÜFUNG VON A) NICHT GESCHLÜPFTEN EMBRYOS, WEIBLICHEN GONADEN UND B) SPERMAPROBEN VON CHIMÄREN AUF CRE-ER ^{T2} -INTEGRATION.	139
ABBILDUNG 70: ÜBERPRÜFUNG VON EMBRYOS AN ED10 AUF CRE-ER ^{T2} -INTEGRATION.	140
ABBILDUNG 71: VERDAU DES DNA-TEMPLATE DES LOXP TCR C β -KONSTRUKTES.	141
ABBILDUNG 72: A) KLONIERUNG DER SGRNA 1425 IN DEN BACKBONE VEKTOR PX333-EGFP_UNIVERSAL. B) ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG ZUR ÜBERPRÜFUNG DER KORREKTEN INTEGRATION DER SGRNA 1425 IN DEN BACKBONE VEKTOR.	142
ABBILDUNG 73: GENOTYPISIERUNG DER LOXP TCR C β ^{KI} -KLONE..	143
ABBILDUNG 74: VERÄNDERUNGEN DER ZYTOTOXISCHEN UND HUMORALEN IMMUNANTWORT IN DEN TCR C β KO-HÜHNERN.	146

11 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE GERÄTE MIT HERSTELLERINFORMATION	22
TABELLE 2: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN MIT HERSTELLERINFORMATION	25
TABELLE 3: VERWENDETE HÜHNERLINIEN	27
TABELLE 4: VERWENDETE ZELLEN IN DER ZELLKULTUR	28
TABELLE 5: VERWENDETE BAKTERIEN	28
TABELLE 6: VERWENDETE ERREGER	28
TABELLE 7: VERWENDETE ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR MIT HERSTELLERINFORMATIONEN	28
TABELLE 8: VERWENDETE ZUSÄTZE IN DER MOLEKULARBIOLOGIE MIT HERSTELLERINFORMATIONEN ..	29
TABELLE 9: VERWENDETE ZUSÄTZE FÜR DIE HISTOLOGIE MIT HERSTELLERINFORMATION	31
TABELLE 10: MANIPULATION-MEDIUM	32
TABELLE 11: PGC-MEDIUM	32
TABELLE 12: PBS	33
TABELLE 13: HYGROMYCIN-STAMMLÖSUNG	33
TABELLE 14: PBS-T	33
TABELLE 15: STM PUFFER	34
TABELLE 16: TEN PUFFER	34
TABELLE 17: PRONASE E-STAMMLÖSUNG	34
TABELLE 18: TISSUE-LYSIS-BUFFER	35
TABELLE 19: TBE -PUFFER	35
TABELLE 20: 6X ORANGE G DNA-LOADING DYE	35
TABELLE 21: DNA 1KP PLUS LADDER	36
TABELLE 22: FLUOBUFFER	36
TABELLE 23: SEPARATION- BUFFER	36
TABELLE 24: LABELING-BUFFER	36
TABELLE 25: COATING-BUFFER	37
TABELLE 26: TMB-BUFFER	37
TABELLE 27: TMB-STAMMLÖSUNG	37
TABELLE 28: TMB-ARBEITSLÖSUNG	37
TABELLE 29: 4%IGE MAGERMILCH	38
TABELLE 30: 4% PFA-LÖSUNG	38
TABELLE 31: LB-MEDIUM	38
TABELLE 32: LB-AGAR	39
TABELLE 33: TRYPTON-SOYA-AGAR	39
TABELLE 34: AMPICILLIN-STAMMLÖSUNG	39
TABELLE 35: ENZYME UND PUFFER MIT HERSTELLERINFORMATION	40
TABELLE 36: POLYMERASEN MIT HERSTELLERINFORMATION	41
TABELLE 37: PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	41
TABELLE 38: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER FÜR DIR DURCHFLUSSZYTOMETRIE	42
TABELLE 39: VERWENDETE MICROBEADS	43
TABELLE 40: ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNHISTOLOGIE	43
TABELLE 41: ANTIKÖRPER FÜR DIE FLUORESCENZHISTOLOGIE	43
TABELLE 42: ELISA-ANTI KÖRPER	44
TABELLE 43: VERWENDETE KITS	44
TABELLE 44: VERWENDETE PRIMER FÜR DIE GESCHLECHTSBESTIMMUNG, GENOTYPISIERUNG UND MHC-HAPLOTYPISIERUNG UND SEQUENCING	45
TABELLE 45: DDP CR PRIMER	47
TABELLE 46: QPCR-PRIMER	47
TABELLE 47: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	49
TABELLE 48: VERWENDETE KONSTRUKTE	50
TABELLE 49: GENERIERTE KONSTRUKTE	50
TABELLE 50: VERENDETE SOFTWARE UND ONLINE-DIENSTE	50
TABELLE 51: MASTERMIXES DER CDNA-SYNTHESE	56

TABELLE 52: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE CDNA-SYNTHESE.....	56
TABELLE 53: MASTERMIXES FÜR DIE GESCHLECHTSBESTIMMUNGS-PCR	57
TABELLE 54: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE GESCHLECHTSBESTIMMUNGS-PCR	57
TABELLE 55: MASTERMIXES FÜR DAS TCR C β KO-GENOTYPING	58
TABELLE 56: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DAS TCR C β KO-GENOTYPING	58
TABELLE 57: MASTERMIX FÜR DAS TCR C γ KO-GENOTYPING	59
TABELLE 58: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DAS TCR C γ KO-GENOTYPING.....	59
TABELLE 59: MASTERMIX FÜR DAS MHC-HAPLOTYPING	60
TABELLE 60: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DAS MHC-HAPLOTYPING	60
TABELLE 61: MASTERMIX FÜR DAS CRE-GENOTYPING	61
TABELLE 62: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DAS CRE-GENOTYPING	61
TABELLE 63: MASTERMIX FÜR DAS LOXP TCR C β ^{KI} -GENOTYPING	62
TABELLE 64: TEMPERATURPROGRAMM FÜR DAS LOXP TCR C β ^{KI} -GENOTYPING	62
TABELLE 65: ZUSAMMENSETZUNG DER AGAROSE-GELE	63
TABELLE 66: VERDAU DER DNA FÜR DIE DDPCR.....	63
TABELLE 67: HEX- UND FAM-PRIMER-MISCHUNGEN	64
TABELLE 68: MASTERMIX DDPCR	64
TABELLE 69: TEMPERATURPROGRAMM DDPCR.....	65
TABELLE 70: MASTERMIX QPCR	65
TABELLE 71: TEMPERATURPROGRAMM QPCR	66
TABELLE 72: ABSTEIGENDE ALKOHOLREIHE FÜR DAS ENTPARAFFINISIEREN VON PARAFFIN-SCHNITTEN	73
TABELLE 73: PHOSPHORYLIERUNG DER OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE CRISPR-KLONIERUNG	79
TABELLE 74: TEMPERATURPROGRAMM FÜR OLIGONUKLEOTIDMIX FÜR DIE CRISPR-KLONIERUNG	79
TABELLE 75: BESTANDTEILE FÜR LIGATION	80
TABELLE 76: TEMPERATURPROGRAMM FÜR LIGATION.....	80
TABELLE 77: BESTANDTEILE FÜR PLASMID-SAFE-REAKTION	80
TABELLE 78: BESTANDTEILE FÜR RESTRIKTIONSVERDAU	82
TABELLE 79: REINHEIT UND ZELLZAHL TRANSFERIERTER MCHERRY ⁺ $\gamma\delta$ T-ZELLEN.	128
TABELLE 80: REINHEIT UND ZELLZAHL TRANSFERIERTER MCHERRY ⁺ $\alpha\beta$ T-ZELLEN.	131

12 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Benjamin Schusser für seine Unterstützung und sein Vertrauen danken. In unseren wöchentlichen Meetings habe ich eine sehr gute und direkte Betreuung erfahren, in welchen ich alle Sorgen und Herausforderungen ansprechen konnte. Ich bin sehr dankbar, dass ich meine Doktorarbeit an diesem Lehrstuhl durchführen konnte.

Mein nächster Dank gilt Dr. Hicham Sid und Dr. Sabrina Schleibinger für eure Unterstützung – ohne euch wäre das hier nicht möglich! Außerdem möchte ich meinen (teilweise ehemaligen) Arbeitskollegen Milena Brunner, Hanna Vikkula, Adrian Donnert, Tom Berghof, Christian Zenner und Mohanned Alhussein danken, dass ihr meinen Arbeitsalltag schöner macht. Hier möchte ich auch die AG Schnieke nennen, vor allem Laura Beltran Sangüesa, Theresa Pauli und Wei Liang, die immer für ein Freitagnachmittags-Bier zu haben sind. Ich möchte mich ebenfalls bei meinen fleißigen Masterstudenten, Teresa Mittermair, Carola Ciarlini und Antonia Schmauser, bedanken für die gute Arbeit. Ein besonderer Dank gilt unseren Technischen Assistentinnen Iulia Poplacean und Lea Radomsky, die mir vieles beigebracht haben und sich engagiert um die Alltagsdinge im Labor kümmern! Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt unseren Tierpflegern, Helga, Michi, Klee und Jens. Euer liebevoller und verantwortungsvoller Umgang mit den Tieren hat diese Arbeit möglich gemacht.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Eltern und meine Schwestern, die mich immer unterstützt haben, meine Träume zu verfolgen. Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Freund Max bedanken, dass er immer für mich da ist und ein offenes Ohr für mich hat, wenn ich Geschichten aus dem Hühnerstall erzähle.

Als letztes möchte ich mich bei der DFG und den FOR5130 ImmunoChick-Kollaborationspartnern unter der Leitung von Prof. Benedikt Kaufer bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben.