

2 Einleitung

2.1 Adoptive zelluläre Immuntherapie

Eine Möglichkeit, konventionelle Therapien von viralen und malignen Erkrankungen zu ergänzen, ist die adoptive zelluläre Immuntherapie. Darunter wird die Infusion von immunologischen Effektorzellen, z.B. T-Lymphozyten, welche die Immunantwort aufrechterhalten bzw. rekonstituieren, verstanden. T-Lymphozyten können isoliert, nach ihrer Spezifität ausgewählt und *ex vivo* über Antigenstimulation und Zugabe von Interleukin-2 (IL-2) expandiert werden. Der adoptive Transfer virusspezifischer T-Zellen wird bereits genutzt, um die Immunität gegen Cytomegalie- oder Epstein-Barr-Virusinfektionen in Patienten mit Immundefizienz zu rekonstituieren (1-3). Des Weiteren zeigte der adoptive Transfer allogener T-Zellen von Knochenmarkspendern in Transplantat-Empfängern mit chronischer myeloider Leukämie kurative Effekte (4-6). Dabei sind die T-Zellen des Spenders fähig, Tumorzellen des Empfängers als fremd zu erkennen und zu zerstören (Transplantat-Gegen-Tumor Effekt). Ebenso könnten T-Zellen, die tumorspezifische (TSA) bzw. tumorassoziierte Antigene (TAA) erkennen, potentiell die Therapie von residualen malignen Erkrankungen ergänzen. Tumorantigene wurden als Zielproteine zytotoxischer T-Zellen (*cytotoxic T cell*, CTL) isoliert und charakterisiert (zusammengefasst in (7)). Vorläufige Studien deuten darauf hin, dass adoptiv transferierte autologe TAA-spezifische T-Zellen die Behandlung von Melanomen unterstützen (8-10). Experimentell wurde die Effizienz der adoptiven zellulären Immuntherapie in Tumor-Mausmodellen gezeigt (zusammengefasst in (11)).

2.2 Generierung von T-Zellen bestimmter Spezifität durch TCR-Gentransfer

Die Spezifität von T-Zellen wird durch T-Zellrezeptoren (*T cell receptor*, TCR) bestimmt und lässt sich durch den Transfer von TCR-Genen, die aus T-Zellklonen mit entsprechender Reaktivität und MHC-Restriktion isoliert wurden, in geeignete Zielzellen übertragen. Es wurde gezeigt, dass sich sowohl humane periphere Blutzellen als auch Maus-T-Zellen mit neuen TCR-Spezifitäten ausstatten lassen (zusammengefasst in (12)). Die Methode des TCR Gentransfers könnte zunehmend an Bedeutung gewinnen, da insbesondere tumorreaktive T-Zellen, die oft durch Toleranzmechanismen deletiert werden, selten aus Patienten isoliert werden können. Außerdem ist es sehr schwer, ausreichende Mengen dieser Zellen *in vitro* zu amplifizieren. Die Reinfusion der mit neuen Spezifitäten ausgestatteten Zellen könnte daher

das endogene T-Zell-Repertoire dieser Patienten erweitern. T-Zellen sind für den Gentransfer attraktiv, da sie einfach zu isolieren sind und *in vitro* manipuliert und amplifiziert werden können. Gentransfertechnologien wurden entwickelt, um die effiziente Transduktion primärer humaner bzw. Maus-T-Zellen mittels retroviraler Vektoren zu erlauben (13-17). Experimente in Mausmodellen haben gezeigt, dass TCR-reprogrammierte T-Zellen in Tumoren akkumulieren (18) und diese in antigenspezifischer Weise abstoßen können (19). In unserem Labor konnten primäre humane T-Zellen mit Nierenzellkarzinom- (*renal cell carcinoma*, RCC) spezifischen TCR ausgestattet werden, deren RCC-spezifische Funktionalität in *in vitro*-Experimenten gezeigt wurde (Engels *et al.*, bisher unveröffentlichte Untersuchungen). Eine weitere Strategie ist der Transfer von chimären TCR (cTCR), in denen antigenbindende Domänen von Antikörpern mit signaltransduzierenden Domänen von T-Zellen bzw. Mastzellen kombiniert sind. Auf diese Weise wird die Antikörperspezifität auf T-Zellen übertragen, deren CTL-Antwort dann MHC-unabhängig ist. Die Anti-Tumoreffizienz dieses Ansatzes konnte *in vitro* gezeigt werden (20-26).

Um die Selbsttoleranz gegenüber TAA zu umgehen, wurden CTL aus HLA-A2 (humanes Leukozytenantigen A2) und human CD8 α -transgenen Mäusen isoliert, die mit humanen Peptiden aus TAA immunisiert worden waren (Abb. 1A) (27-29). Dieser Ansatz erlaubte die Isolation von Maus-TCR, die spezifisch für humane TAA-Peptid/MHC-Komplexe sind. Des Weiteren wurden allorestrierte, TAA-spezifische humane T-Zellen generiert (Abb. 1B). Dazu wurden humane periphere mononukleäre Blutzellen (*peripheral mononuclear blood cells*, PBMC) aus HLA-A2⁻ Donoren mit HLA-A2⁺ antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC), die mit Peptiden aus TAA beladen waren, stimuliert (29, 30). Durch Subklonierung wurden CTL isoliert, die spezifisch mit HLA-A2⁺/TAA⁺ Zielzellen reagierten. Der Transfer der so generierten TCR-Gene konnte humane periphere T-Zellen mit TAA-Spezifität ausstatten (29, 31). Die Affinität von TCR kann durch *in vitro* Mutagenese von TCR-Genen erhöht werden, wodurch die T-Zellantwort optimiert werden könnte (Abb. 1C) (32, 33). Eine weitere Technologie ist die Expression von antigenbindenden Einzel-Ketten-Antikörper-Fragmenten (*variable single chain antigen binding fragment*, scFv) in Phagen, welche die Selektion von Antikörperfragmenten ermöglicht, die spezifisch MHC/Peptid-Komplexe binden. Hochaffine antigenbindende Domänen wurden mit signaltransduzierenden Domänen fusioniert und in humane T-Zellen transferiert, die dadurch mit TAA-Spezifität ausgestattet wurden (34).

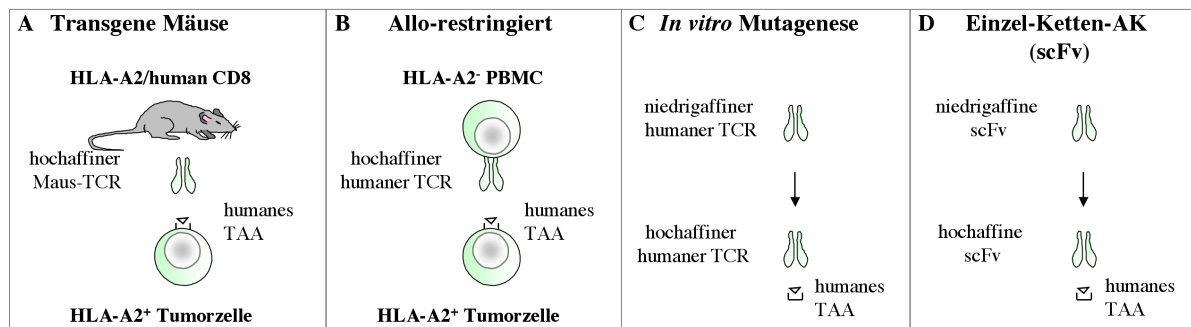


Abb. 1: Generierung TAA-spezifischer hochaffiner CTL (modifiziert nach (35)). Hochaffine TCR, die TAA-Epitope erkennen, die von HLA-Klasse-I präsentiert werden (z.B. HLA-A2), können, unter Nutzung des TCR Repertoires von gesunden Mäusen (A) bzw. Menschen (B), die für diese A2-präsentierten Epitope von TAA nicht tolerant sind, gewonnen werden. Des Weiteren können hochaffine TCR (C) oder hochaffine Einzelketten-Antikörper-Moleküle (D) mit HLA/TAA-Spezifität selektiert werden. HLA, humanes Leukozytenantigen; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; scFv, variable Einzelketten-Antikörper-Domänen; TAA, tumorassoziiertes Antigen.

2.3 Der T-Zellrezeptorkomplex und die Antigenerkennung durch T-Zellen

Als Teil der adaptiven Immunantwort ist die durch T-Zellen vermittelte zelluläre Immunantwort hochgradig antigenspezifisch. Diese Spezifität wird durch die vielfältigen TCR erreicht, die von T-Zellen exprimiert werden. Die meisten T-Zellen tragen einen $\alpha\beta$ -TCR (Abb. 2), bestehend aus einer α - und einer β -Polypeptidkette, die miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Dieses α/β -Heterodimer ist im Komplex mit invarianten CD3-Proteinen (ζ , η , ϵ und δ -Polypeptidketten) in die Zellmembran integriert (36). Die CD3-Proteine verbinden sich intrazellulär mit dem TCR, transportieren ihn an die Zelloberfläche und sind weiterhin für die Signalübertragung und damit für die Aktivierung der T-Zellen verantwortlich. Der TCR besitzt eine konstante und eine variable Domäne. Die variable Domäne erkennt spezifisch das Antigen in Form eines kurzen Peptidfragmentes, das durch den Abbau von Antigenen innerhalb der Zielzelle entstanden ist. Peptidbindende Glykoproteine, die MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC), binden diese Fragmente innerhalb der Zielzellen und transportieren sie als Peptid/MHC-Komplexe an die Zelloberfläche. Korezeptoren kooperieren bei der Antigenerkennung mit dem TCR. Sie binden in weiter Entfernung von der peptidbindenden Furche an den invarianten Teil der MHC-Moleküle. Korezeptoren sind CD4- bzw. CD8-Proteine. Helfer-T-Zellen (T_H) exprimieren CD4-Proteine. Sie erkennen MHC-Klasse-II-Moleküle, d.h. sie sind MHC-Klasse-II restringiert. CTL exprimieren CD8-Proteine und sind MHC-Klasse-I restringiert

(37). CD4- und CD8-Proteine verstärken die Zell/Zell-Adhäsion, wirken bei der T-Zellaktivierung mit und sind für die Entwicklung der T-Zellen notwendig. Korezeptoren erhöhen die Empfindlichkeit der T-Zellen für ein Antigen ca. 100-fach.

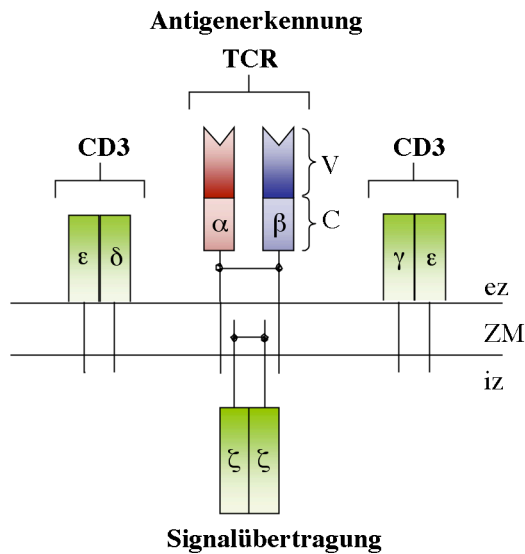


Abb. 2: Skizze des TCR/CD3-Komplexes (modifiziert nach (38)). $\alpha\beta$ -TCR-Heterodimere erkennen in antigenspezifischer Weise Peptid/MHC-Komplexe. CD3 Moleküle sind dabei für die Signalübertragung verantwortlich. $\alpha\beta$ -TCR/CD3-Komplexe können nur zusammen an die T-Zelloberfläche transportiert werden. C, konstante Region; ez, extrazellulär; iz, intrazellulär; V, variable Region; ZM, Zellmembran.

2.4 Die Vielfalt der T-Zellrezeptoren

Erbliche Grundlage der TCR-Diversität sind die zahlreichen Gensegmente, welche die TCR-Ketten kodieren. Die Gensegmente für die variablen (V), *joining*- (J), *diversity*- (D) und konstanten (C) Bereiche der TCR sind getrennt in drei Loci angeordnet, den so genannten α -/ β -, δ - und γ -Loci (39). Im α -Locus der Maus gibt es 70-80 $V\alpha$ -, 61 $J\alpha$ - sowie ein $C\alpha$ -Segment (Abb. 3) (38). Der TCR α -Locus befindet sich innerhalb des β -Locus zwischen den V- und J-Segmenten (nicht dargestellt). Im β -Locus gibt es ca. 52 funktionelle $V\beta$ -Segmente, die in einiger Entfernung von zwei getrennten Clustern liegen, die jeweils ein $D\beta$ -, 6-7 $J\beta$ - sowie ein $C\beta$ -Gensegment enthalten. Jedem $V\beta$ - bzw. $V\delta$ -Segment steht eine *leader*- (L) Sequenz voran, die das Protein für den Transport an die Zelloberfläche ins endoplasmatische Retikulum (ER) dirigiert. Während der Entwicklung der Thymozyten werden durch zufällige somatische Rekombinationen der separaten V-, J- (α -Kette) bzw. V-, D-, J- (β -Kette) Gensegmente diverse TCR α - bzw. β -Kettengene gebildet. Bei der α -Kette rekombinieren zunächst ein $V\alpha$ - und ein $J\alpha$ -Segment, wodurch bei produktiver Umlagerung ein

funktionelles Exon entsteht (Abb. 4). Transkription und Spleißen des $VJ\kappa$ -Exons an $C\kappa$ bilden die mRNA, die translatiert wird. Bei der Umordnung der κ -Ketten rekombinieren zunächst ein $D\kappa$ - und ein $J\kappa$ -Segment. Anschließend wird durch Rekombination eines $DJ\kappa$ - und eines $V\kappa$ -Segmentes ein funktionelles Exon gebildet, das transkribiert und an $C\kappa$ gespleisst wird. Die entstandene mRNA wird zur TCR κ -Kette translatiert. Die Variabilität an den Verknüpfungsstellen wird durch zufälliges Entfernen bzw. Einfügen von Nukleotiden erhöht. Die zufällige Kombination der verschiedenen TCR κ - und α -Ketten zu TCR-Heterodimeren trägt zur Entstehung vielfältiger TCR bei. Die höchste Variabilität ist bei T-Zellen innerhalb der dritten komplementaritätsbestimmenden Region (*complementary determining region 3*, CDR3) zu finden, die das Zentrum der Antigenbindungsstelle bildet. Die CDR3-Region wird von D- und J-Gensegmenten und den zufällig eingefügten Nukleotiden kodiert.

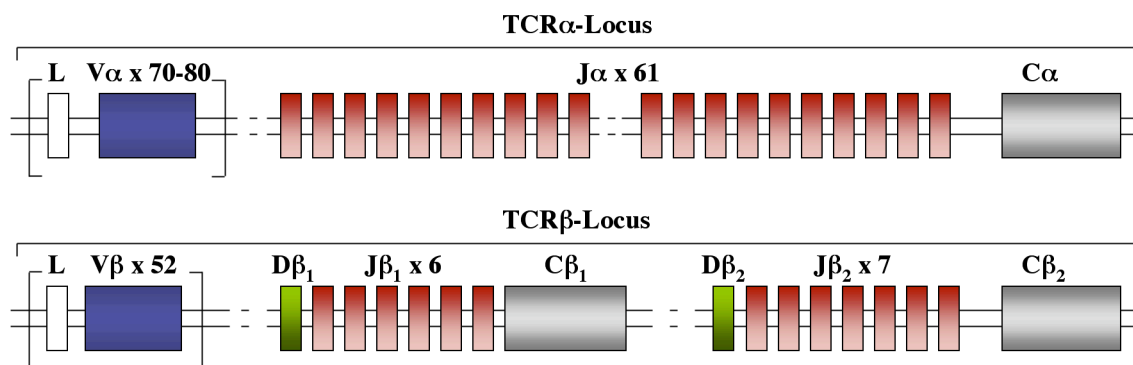


Abb. 3: Die Organisation der Gene für die α - und β -Kette der TCR der Maus (modifiziert nach (38)). Der TCR α -Locus kodiert 70-80 V α - und 61 J α -Gensegmente sowie ein C α -Segment. Im TCR β -Locus gibt es ca. 52 V β -Segmente sowie zwei Cluster von je einem D β -, 6-7 J β - und je einem C β -Segment. Jedem V α - bzw. V β -Segment steht eine L-Sequenz voran, die das Protein für den Transport an die Zelloberfläche ins endoplasmatische Retikulum (ER) dirigiert. C, konstant; D, *diversity*; J, *joining*; L, *leader*; V, variabel.

2.5 Die Klonalität der $\alpha\beta$ T-Zellen

T-Zellen exprimieren normalerweise nur TCR einer einzigen Spezifität, d.h. sie sind klonal. Diese Klonalität wird dadurch gewährleistet, dass die Umordnung der Gene für die TCR α - und β -Kette eine genau festgelegte Abfolge durchläuft (38). Zuerst werden die β -Ketten-Gene rearrangiert (Abb. 5). Nach erfolgter produktiver Umlagerung der β -Ketten-Gene wird das β -Kettenprotein zusammen mit dem konstanten Prä- β -Kettenprotein (pT β) auf der Zellober-

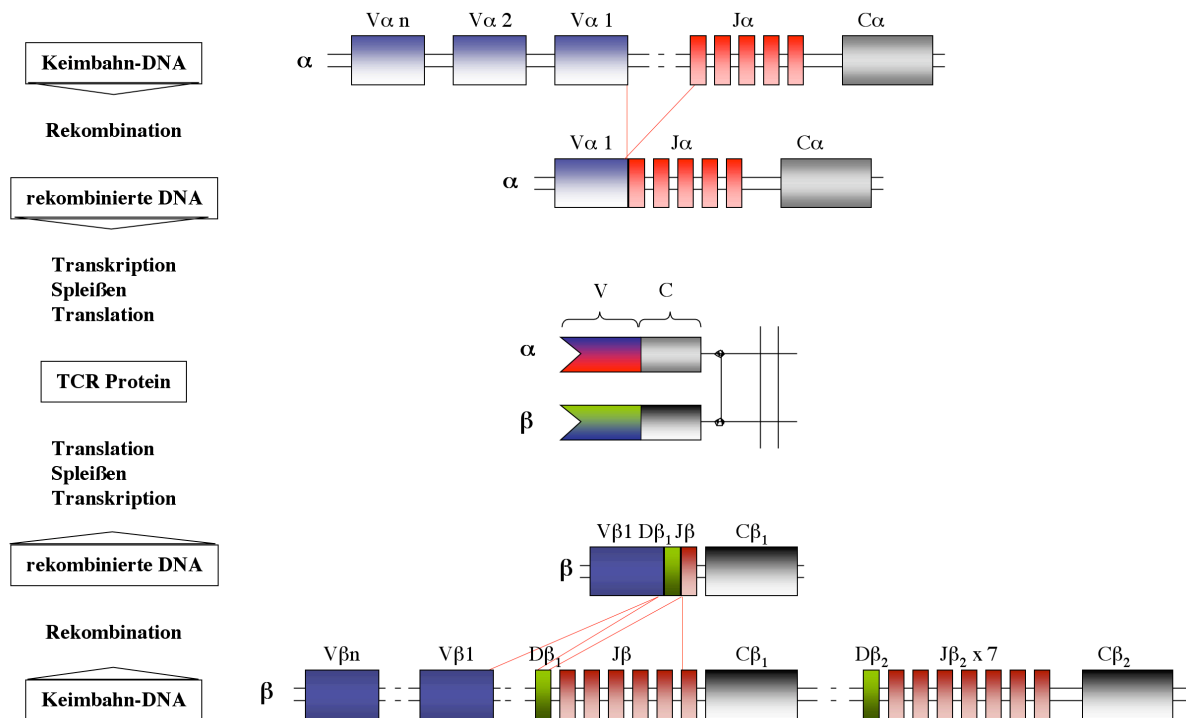


Abb. 4: Umordnung und Expression TCR α - und β -Kettengene (modifiziert nach (38)). Die TCR Gensegmente werden während der Entwicklung der T-Zelle durch somatische Rekombination verknüpft. Die V α - und J α -Segmente bilden nach Rekombination ein funktionelles Exon. Durch Transkription und Spleißen des VJ α an C α bildet sich die mRNA, die translatiert wird. Die Rekombination der V β -, D β - und J β -Segmente führt zu einem funktionellen β -Exon, das transkribiert und an C β gespleißt wird. Die entstandene mRNA wird in das TCR β -Protein translatiert. Aus TCR α - und β -Kette bildet sich das TCR Heterodimer. C, konstant; D, *diversity*; J, *joining*; L, *leader*; V, variabel.

fläche exprimiert. Die Expression dieses Prä-TCR löst eine schnelle Proliferation der Zellen aus und unterbindet gleichzeitig die Umordnung weiterer β -Ketten-Gene, indem unter anderem die Endonukleasen Rag1 und Rag2 (Produkte der rekombinationsaktivierenden Gene), welche die Rekombination der Rezeptorgene veranlassen, inaktiviert bzw. abgebaut werden. Weitere Mechanismen, wie die Regulation der Chromatinstruktur bzw. der Einfluss von Promotoren, *Enhancern* oder Rekombinationssignalsequenzen, scheinen für die Steuerung der TCR-Genexpression wichtig zu sein (39). Normalerweise wird in jeder T-Zelle ein β -Ketten-Gen exprimiert. Parallel dazu wird die Expression der Korezeptorproteine CD4 und CD8 induziert. Nach Beendigung der Proliferationsphase wird die erneute Expression der Rag1- und Rag2-Gene und damit die Umlagerung der β -Kettengene induziert. Die β -Kettenproteine werden zusammen mit den α -Kettenproteinen als $\alpha\beta$ -Heterodimere exprimiert. Letztere interagieren während der Selektion im Thymus mit Peptid/MHC-

Molekülen. Die β -Kettengene werden bis zu einer positiven Selektion der T-Zellen umgeordnet, was dazu führt, dass reife T-Zellen häufig zwei β -Ketten-Proteine exprimieren. Des Weiteren können β -Kettengene nacheinander auf beiden Chromosomen rearrangiert werden und sind daher weniger stringent dem Allelausschluss unterworfen. Allelausschluss bedeutet, dass in einer Zelle nur ein Gen von einem der beiden elterlichen Chromosomen exprimiert wird. TCR-transgene Mäuse, die bereits umgeordnete β - und α -Ketten-Transgene besitzen, exprimieren die transgenen TCR-Ketten auf den meisten ihrer T-Zellen, wodurch die Umordnung der endogenen Gene für die TCR-Ketten weitestgehend unterbunden wird. Der vollständige Ausschluß von endogenen TCR ist jedoch nur möglich, wenn den Mäusen eines der beiden Rag-Gene fehlt.

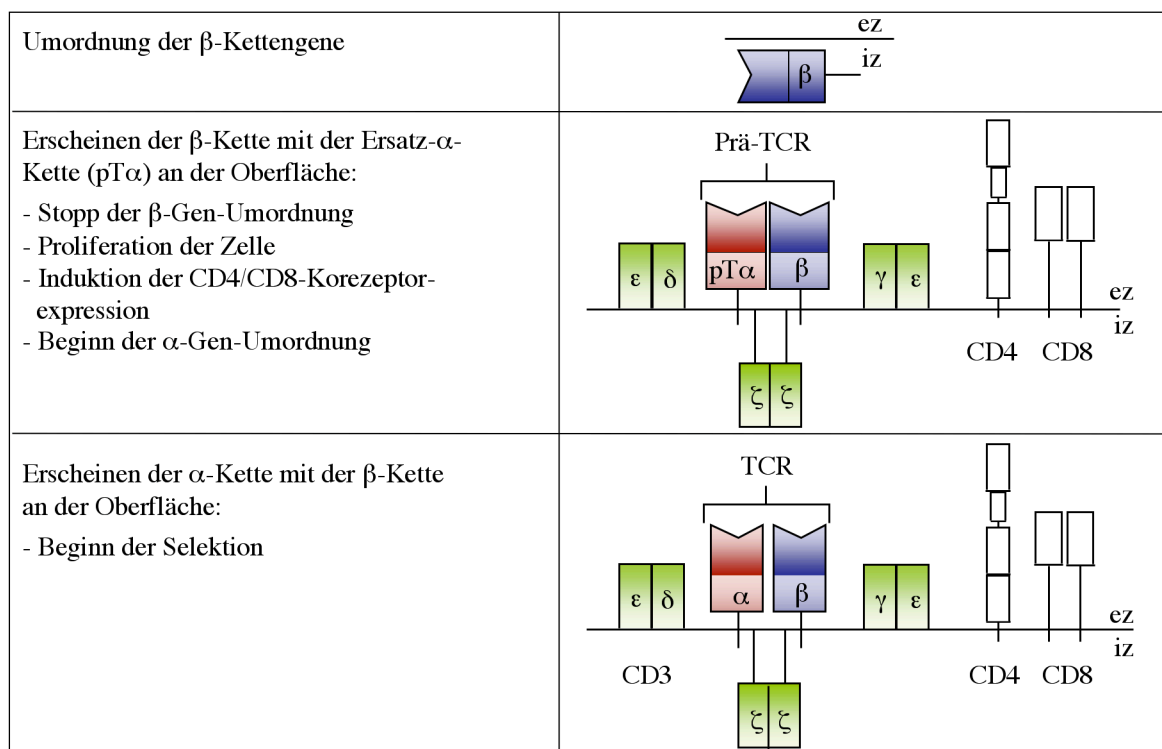


Abb. 5: Die Abfolge der Genumordnung bei $\beta\beta$ T-Zellen (modifiziert nach (38)). Gezeigt ist die Abfolge der TCR-Kettenexpression bei $\beta\beta$ -T-Zellen. Die Gene für die β -Kette werden zuerst umgeordnet. Aufgrund der Expression einer funktionsfähigen β -Kette in Form eines Prä-TCR auf ihrer Oberfläche erhält die T-Zelle das Signal, sich zu teilen, die Genumlagerung für die α -Kette einzustellen, CD4 und CD8 zu exprimieren und schließlich das Gen für die α -Kette zu rearrangieren, bis der $\beta\beta$ -TCR exprimiert und positiv selektioniert wird. ez, extrazellulär; iz, intrazellulär; pT α , Prä- α -Kette.

2.6 Mechanismen der Toleranz

Die Selektion der T-Zellen im Thymus stellt sicher, dass T-Zellen, die gegen Autoantigene gerichtet sind bzw. die mit den MHC-Molekülen des eigenen Organismus keine optimale Bindung eingehen, nicht in die Peripherie gelangen. Der TCR interagiert dazu mit den MHC-Molekülen der Epithelzellen des Thymus. In Thymozyten, die Selbst-MHC-Moleküle nicht, nur schwach oder zu stark binden, wird der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert (Tab. 1). Nur Thymozyten, die eine mittelstarke Selbst-MHC-Bindung eingehen, werden positiv selektioniert. Durch die anschließende negative Selektion wird Apoptose in Thymozyten induziert, die körpereigenes Antigen mit hoher Avidität erkennen. Letzteres führt dazu, dass nur T-Zellen, die nicht gegen die im Thymus exprimierten Autoantigene gerichtet sind, ausreifen und als funktionsfähige T-Zellen in die Peripherie auswandern.

Tab. 1: Selektion der T-Zellen im Thymus (40):

Selbst-MHC-Bindung	Autoantigenerkennung	Schicksal
fehlt oder schwach	-	Zelltod
stark	-	Zelltod
mittelstark	ja	Zelltod
mittelstark	nein	vollständige Reifung

Da viele periphere gewebespezifische Proteine nicht oder nicht in ausreichender Höhe durch APC im Thymus exprimiert werden und T-Zellen mit geringer TCR-Expressionshöhe bzw. TCR-Affinität der zentralen Toleranz entkommen, ist die Deletion selbstreaktiver T-Zellen im Thymus unvollständig (41-48). Durch Mechanismen der peripheren Toleranz (zusammengefasst in (49)), die entweder direkt auf selbstreaktive T-Zellen (T-Zell-intrinsisch) oder indirekt über zusätzliche Zellen (T-Zell-extrinsisch) wirken, wird normalerweise sichergestellt, dass autoaggressive T-Zellen in der Peripherie kontrolliert werden (Abb. 6). Zu den intrinsischen Toleranzmechanismen zählt, dass potentiell autoreaktive T-Zellen periphere Autoantigene bei sehr geringer Expressionshöhe bzw. fehlender Kreuzpräsentation ignorieren. Des Weiteren kann in T-Zellen bei Abwesenheit kostimulatorischer Moleküle oder bei Signalübermittlung durch z.B. das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) Anergie, d.h. funktionelle Inaktivierung, induziert werden. Weiterhin lösen T-Zellen, die durch Autoantigene aktiviert werden, aber einen durch bestimmte Zytokin- und Zytokinrezeptor-Expressionsmuster gekennzeichneten nicht-pathogenen Phänotyp entwickeln, keine Autoimmunität aus. Schließlich könnte in

selbstspezifischen T-Zellen bei wiederholter Begegnung mit peripheren Autoantigenen der durch Aktivierung induzierte Zelltod, vermittelt durch Bindung des Fas-Liganden an den Todesrezeptor Fas, induziert werden. T-Zell-extrinsisch wirken unreife dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC), die periphere Antigene kreuzpräsentieren und in T-Zellen periphere Toleranz oder Anergie induzieren. Darüber hinaus erhalten regulatorische T-Zellen die periphere Toleranz aufrecht.

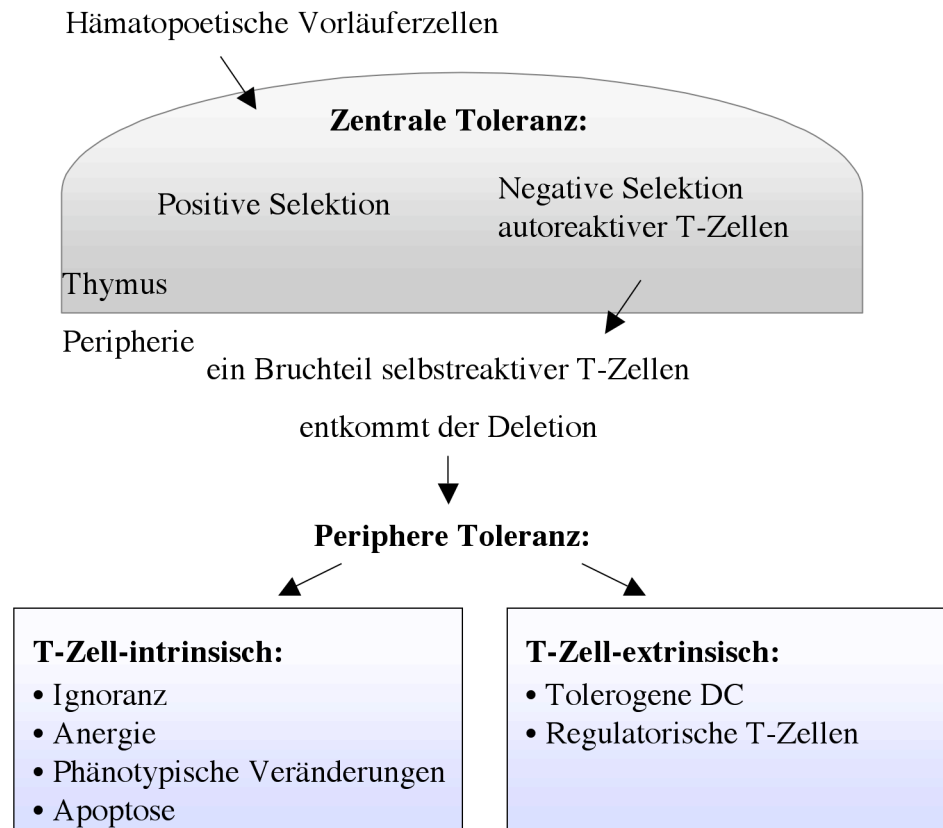


Abb. 6: Toleranzmechanismen (modifiziert nach (49)). Hämatopoetische Vorläuferzellen werden, basierend auf den Interaktionen der TCR mit den Peptid/MHC-Komplexen, im Thymus positiv bzw. negativ selektioniert (zentrale Toleranz). Einige autoreaktive T-Zellen gelangen in die Peripherie, wo sie durch periphere Toleranzmechanismen, die entweder direkt auf autoreaktive T-Zellen (T-Zell-intrinsisch) oder indirekt über andere Zellen (T-Zell-extrinsisch) wirken, kontrolliert werden.

2.7 Ignoranz, Tumorabstoßung und Autoimmunität

Wie zuvor beschrieben, werden in gesunden Individuen viele Selbstantigene, die ausschließlich in der Peripherie exprimiert werden, immunologisch von hoch aviden T-Zellen ignoriert (50-53). Die Ignoranz der T-Zellen kann eingebüßt werden, wenn das Immunsystem von bestimmten Krankheitserregern herausgefordert wird und nachfolgend fälschlicherweise

Selbstantigene erkennt. In verschiedenen Mausmodellen wurden mikrobielle Infektionen mit der Induktion bzw. Ausweitung von Autoimmunität, z.B. von Multiper Sklerose (54) und Myokarditis (55), assoziiert. Dabei spielten durch die Infektion ausgelöste unspezifische inflammatorische Effekte als auch das Freiwerden zuvor ignoriertes Antigens eine Rolle (*Epitope Spreading*). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Virusinfektionen Autoimmunerkrankungen in Mäusen induzieren, die für das virale Antigen transgen sind, dieses aber zuvor ignoriert haben (41-43, 53). Außerdem können virale Antigene, die Antigenen ihres Wirtes ähnlich sind, selbstreaktive T-Zellen aktivieren (molekulare Mimikry) (55, 56).

Bei den meisten der bisher charakterisierten Tumorantigene handelt es sich nicht um somatisch mutierte TSA, sondern um nicht mutierte Selbstantigene, die von Tumorzellen überexprimiert, bevorzugt exprimiert oder re-exprimiert werden, sogenannte *shared TAA*. Die Anwesenheit von hochaffinen TAA-spezifischen CTL in Tumorpatienten lässt vermuten, dass diese TAA in der Peripherie tolerieren (57-59). Deshalb ist ein experimenteller Ansatz der Tumortherapie, die Toleranz des Immunsystems gegenüber TAA zu überwinden. In verschiedenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Ignoranz gegenüber Surrogat-TAA, wie Lymphochoriomeningitisvirus- (LCMV-) Glykoprotein-Peptid (gp33) in Ratteninsulin-Promotor-gp33 (RIP-gp33) oder RIP-SV40-*Large T* Antigen-gp33 (RIP-Tag-gp33) transgenen Mäusen bzw. β -Galaktosidase in LacZ-transgenen Mäusen, durch LCMV-Infektion oder den adoptiven Transfer von Effektor-T-Zellen (T_E) (51) bzw. DC-Vakzinierung (46) gebrochen werden kann. Die Aufhebung der Ignoranz gegenüber TAA ist in vielen Modellen von der Induktion von Autoimmunität begleitet (46, 47, 60). Andere Studien zeigten, dass Immunantworten gegen Tumoren, die durch Vakzinierung mit TAA oder den adoptiven Transfer selbstantigen-spezifischer T-Zellen induziert wurden, in Abwesenheit von Autoimmunität erfolgten (61-65). Moderate Autoimmunantworten, welche die Tumorabstoßung begleiten, könnten akzeptierbar sein. Das Auftreten von Vitiligo in Melanompatienten wird z.B. mit einer verbesserten Prognose assoziiert (66). Letzteres unterstützt die Vermutung, dass es ein therapeutisches Fenster zwischen der Induktion von Tumorummunität und Autoimmunität geben kann.

2.8 Natürliche und transgene Dual-TCR-T-Zellen

Die meisten T-Zellen exprimieren nur TCR einer Spezifität auf der Zelloberfläche. Aufgrund des nicht absoluten Allelausschlusses entstehen periphere T-Zellen, die TCR mit zwei verschiedenen Spezifitäten exprimieren, auf natürliche Weise. Geschätzt wird, dass ca. 20-30% der humanen und 7-21% der Maus-T-Zellen zwei α -Ketten auf der Zelloberfläche exprimieren (67, 68). Weiterhin gibt es humane und Maus-T-Zellen, die zwei α -Ketten exprimieren, deren Häufigkeit auf ca. 1% geschätzt werden kann (69, 70).

Dual-TCR-transgene (Dtg) Mäuse bieten eine Möglichkeit, T-Zellen mit zwei verschiedenen TCR-Spezifitäten zu analysieren. Diese Mäuse unterscheiden sich hinsichtlich der Expression beider TCR-Transgene auf peripheren T-Zellen. Einige Dtg Mäuse exprimieren beide TCR nicht simultan auf einer T-Zelle, obwohl alle vier mRNA translatiert wurden, indizierend, dass die Oberflächenexpression des zweiten TCR nach Translation blockiert wurde (71). Letzteres könnte ein Mechanismus sein, der funktionell die allele Exklusion ergänzt. Auf der anderen Seite konnten CD4 und CD8 Dual-TCR-T-Zellen in Dtg Mäusen nachgewiesen werden (71-81). Die Bedeutung Dual-TCR-transgener T-Zellen ist jedoch bisher ungeklärt. Einerseits wird vermutet, dass Dual-TCR-T-Zellen bei der Induktion von Autoimmunität eine Rolle spielen könnten. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass T-Zellen, die selbstspezifische TCR in geringer Dichte auf der Zelloberfläche tragen, zentralen Toleranzmechanismen durch die Expression eines zweiten, positiv selektionierten TCR entkommen können (72, 73, 75). Diese T-Zellen können dann den autospezifischen TCR trotz der geringen Expressionshöhe nutzen, um Autoimmunität zu induzieren. Untersuchungen in einem weiteren Mausmodell zeigten, dass die geringe Expression eines selbstspezifischen TCR auf Dual-TCR-T-Zellen ausreicht, um spontan Autoimmunität zu induzieren (76). Die *in vivo* Antigenstimulation dieser Dual-TCR-T-Zellen über den selbstspezifischen TCR mit sehr geringer Expressionshöhe induzierte dagegen Anergie und schützte vor Ausbruch der Autoimmunerkrankung. Andererseits gibt es Spekulationen, nach denen Dual-TCR-T-Zellen das Immunrepertoire für Fremdanigene erweitern könnten (80).

2.9 Dual-TCR-T-Zellen durch TCR-Gentransfer

Periphere T-Zellen, die aus dem Blut isoliert werden können, sind bereits mit eigenen TCR jeweils einer Spezifität ausgestattet. Daher werden durch TCR-Gentransfer T-Zellen generiert, welche die Gene zweier TCR exprimieren können. Bisher ist wenig darüber bekannt, wann

zwei TCR auf einer T-Zelle exprimiert werden und inwieweit sie sich gegenseitig beeinflussen. Die Expression von TCR mit zwei verschiedenen Spezifitäten auf einer T-Zelle könnte die Qualität und das Verhalten von T-Zellen beeinflussen. Voraussetzung für die Funktionalität einer T-Zelle ist, dass eine ausreichende Anzahl der TCR exprimiert wird (82). Die Konkurrenz um Komponenten des TCR-Komplexes, die zur Expression des TCR auf der Oberfläche notwendig sind, könnte zu schwacher Expression eines der beiden TCR führen und dadurch mit dem Verlust einer Antigenreaktivität einhergehen. Durch die Paarung der nicht miteinander verwandten TCR-Ketten in Dual-TCR-T-Zellen würden neue Spezifitäten entstehen, die gegen Autoantigene gerichtet sein könnten (Abb. 7A). Weiterhin würde die Entstehung dieser neuen Spezifitäten die Expressionshöhe der gewünschten Heterodimerpaarung beeinflussen. Die Aktivierung von Dual-TCR-T-Zellen mit einem spezifischen Antigen könnte zu Effektorfunktionen führen, die über den TCR mit der zweiten Spezifität ausgeführt wird, auch wenn dieser nicht direkt mit spezifischem Antigen aktiviert wurde. Da die Toleranz peripherer T-Zellen nicht absolut ist, existieren hochavide T-Zellen, die potentiell periphere Autoantigene erkennen können, diese aber ignorieren. Weiterhin findet man in der Peripherie T-Zellen mit geringer Avidität, die zentralen Toleranzmechanismen entkamen. Diese potentiell autoreaktiven T-Zellen haben keinen Zugang zu den meisten antigenexprimierenden somatischen Geweben, solange sie naiv sind, da ihre Zirkulation dann auf Blut- und lymphatisches Gewebe beschränkt ist (83) (Abb. 7B). Außerdem wird Autoimmunität durch periphere Toleranzmechanismen erhalten. Adoptiv transferierte, mit neuem TCR ausgestattete T-Zellen, die über den eingeführten TCR aktiviert wurden, könnten den autospezifischen endogenen TCR zur Migration in autoantigen-exprimierende periphere Gewebe nutzen und die periphere Toleranz überwinden. Sie besitzen daher potentiell die Fähigkeit, Autoimmunität zu induzieren.

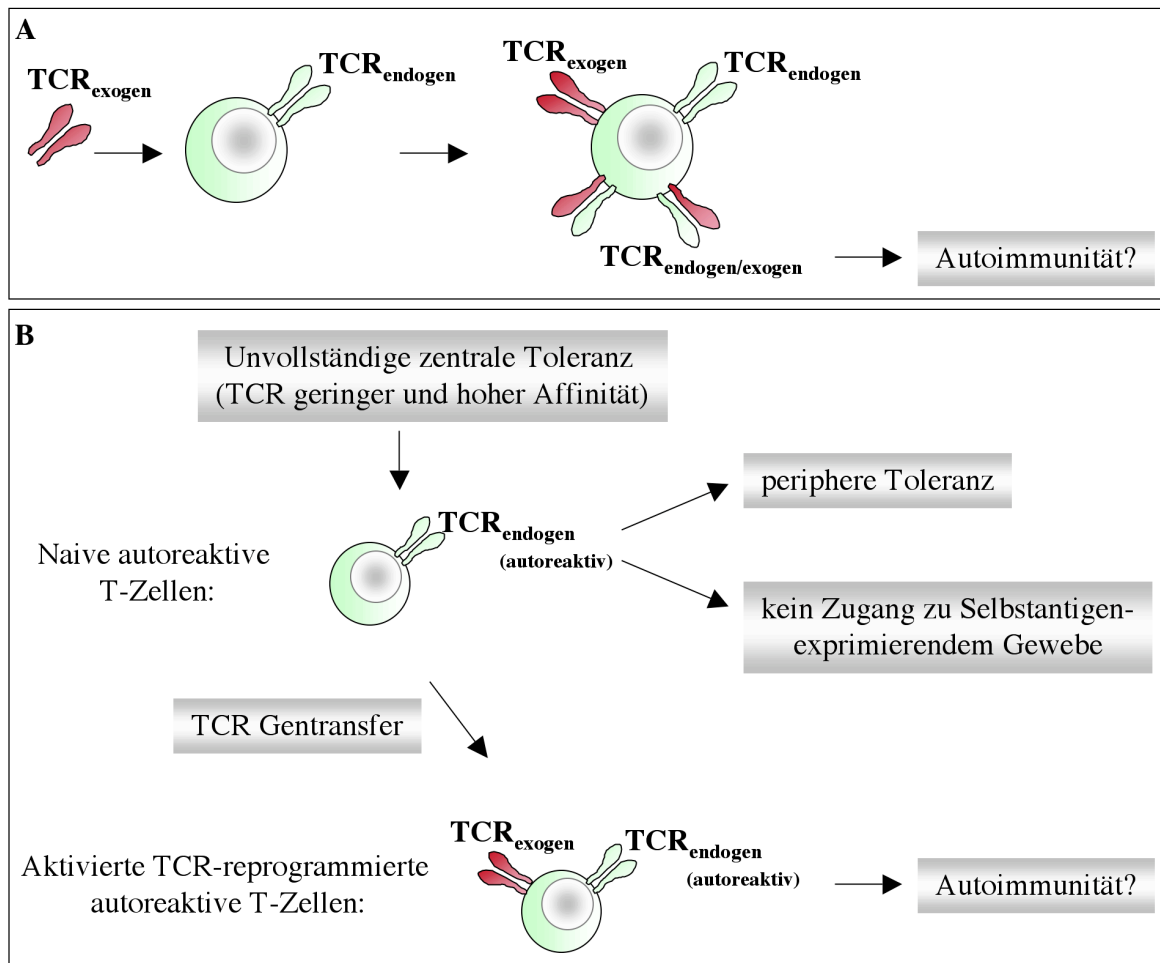


Abb. 7: Gefahr der Autoimmunität nach adoptivem Transfer von TCR-reprogrammierten T_E.
A, Die Bildung hybrider TCR-Dimere, bestehend aus endogenen und exogenen TCR-Ketten, würde zu neuen Spezifitäten, von denen einige gegen Autoantigene gerichtet sein könnten, führen. **B**, Das Schicksal peripherer autoreaktiver T-Zellen, die zentralen Toleranzmechanismen entkamen, hängt unter anderem von deren Aktivierungsstatus ab. Naive autoreaktive T-Zellen migrieren nicht in periphere Gewebe und werden von peripheren Toleranzmechanismen kontrolliert. Adoptiv transferierte TCR-reprogrammierte autoreaktive T_E könnten in periphere Gewebe einwandern bzw. die periphere Toleranz aufheben.