

5 Ergebnisse

5.1 OT-I/P14 Dtg-T-Zellen exprimieren beide TCR und haben doppelte Spezifität

Dual-TCR-transgene Mäuse exprimieren nicht notwendigerweise beide TCR-Transgene auf der Oberfläche einer T-Zelle (71). Deshalb untersuchten wir, ob OT-I/P14 Dtg Mäuse Dual-TCR-T-Zellen generieren. Wir verpaarten OT-I und P14 TCR-transgene Mäuse, die genetisch C57Bl/6 Hintergrund hatten. Bei diesen Mausstämmen war die Anwesenheit endogener TCR durch das Fehlen des Rag1-Gens ausgeschlossen. Lymphozyten aus Stg und Dtg Mäusen (65 bis 73%) exprimierten CD8-Korezeptoren (Abb. 12A), waren aber CD4⁻ (Daten nicht gezeigt). OT-I T-Zellen (98%) und P14 T-Zellen (100%) exprimierten ausschließlich V α 5- bzw. V α 8-TCR-Ketten (Abb. 12B). OT-I/P14 Dtg Mäuse exprimierten beide TCR α -Ketten auf ca. 90% der T-Zellen. Die restlichen 9% der Dtg-T-Zellen exprimierten nur die V α 5-Kette des OT-I TCR. OT-I (99%) und P14 (99%) Stg-T-Zellen banden ausschließlich die rekombinanten Peptid/MHC-Komplexe (Tetramere) K^b/ova257 bzw. D^b/gp33 (Abb. 12C). Dtg-T-Zellen banden beide Tetramere (81%) oder nur die K^b/ova257 Tetramere (18%). Letzteres bestätigt, dass beide TCR auf den meisten der OT-I/P14 T-Zellen exprimiert werden. T-Zellen von Dtg Mäusen zeigten Variabilitäten in der Expression beider TCR (73 \pm 20%) und der alleinigen Expression des OT-I TCR (21 \pm 8%). Die Expressionshöhe des OT-I TCR auf Dtg-T-Zellen war vergleichbar mit der auf Stg OT-I T-Zellen (Abb. 12D, E). Die Höhe der P14 TCR-Expression auf Dtg-T-Zellen war im Vergleich zu der auf P14 Stg-T-Zellen reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mehrheit der OT-I/P14 Dtg-T-Zellen beide TCR exprimieren und spezifisch beide Tetramere binden, während OT-I und P14 T-Zellen von Stg Mäusen nur jeweils eine Spezifität, die für ova257 bzw. gp33 Tetramere, haben.

5.2 OT-I/P14 Dtg-T-Zellen sind funktionell aktiv und reagieren auf beide Peptide *in vitro*

Um zu analysieren, ob Dtg-T-Zellen *in vitro* auf beide Peptide reagieren, wurden CFSE markierte Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen in Anwesenheit von 1 μ M ova257, gp33, einer Mischung von je 1 μ M ova257 und gp33 oder Medium allein kultiviert. Nach 72 h wurden die T-Zellen mit mAK, die gegen CD8 gerichtet waren, gefärbt. Die Proliferationsrate wurde mittels DFZ bestimmt, indem die Abnahme der CFSE Fluoreszenz analysiert wurde. OT-I Stg-T-Zellen (92%) teilten sich nur nach ova257 und nicht nach gp33

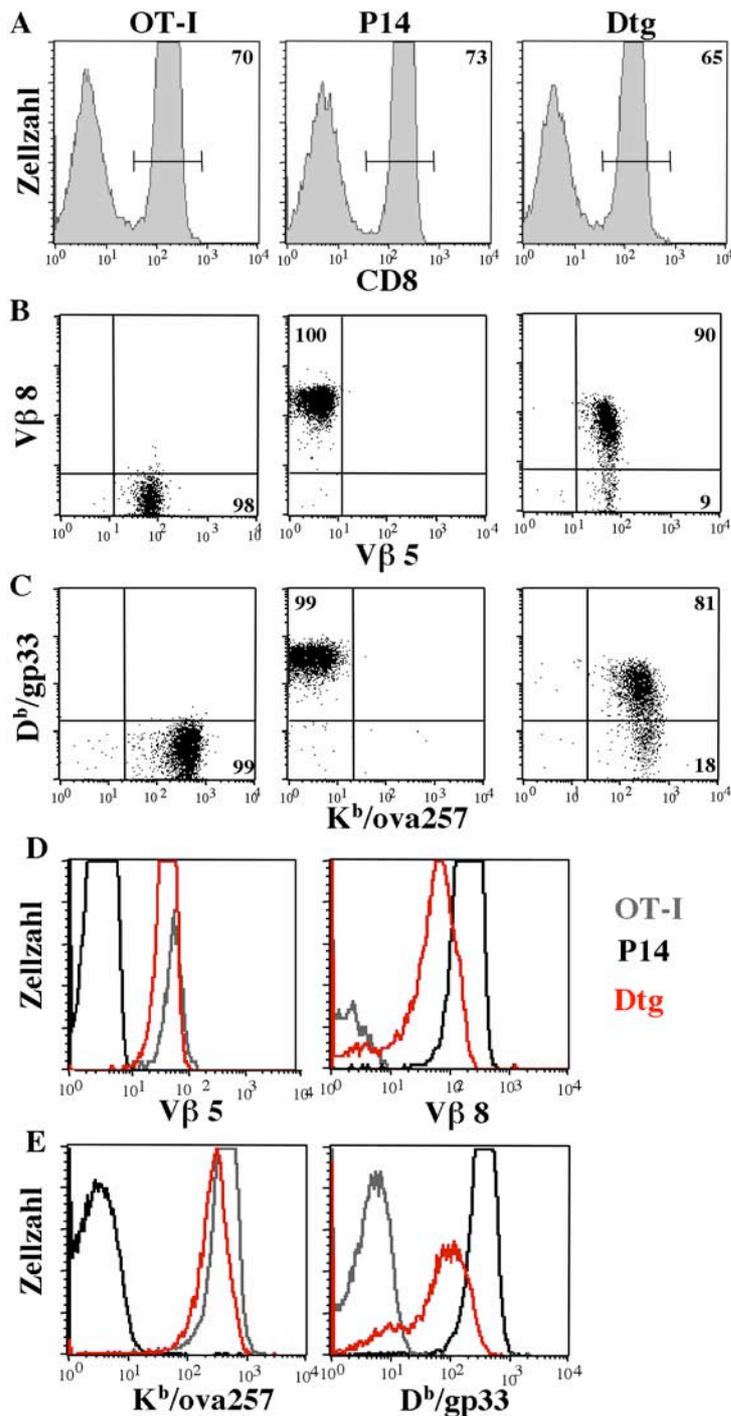


Abb. 12: OT-I/P14 Dtg-T-Zellen exprimieren beide TCR und haben doppelte Spezifität. Milzzellen von OT-I, P14 oder Dtg Mäusen wurden mittels DFZ nach Färbung mit mAK, die gegen CD8, V β 5 und V β 8 gerichtet waren bzw. nach Färbung mit Anti-CD8-mAK und den Tetrameren K^b/ova257 und D^b/gp33 analysiert. Gezeigt ist die CD8-Expression der Lymphozyten (A), die V β 5- und V β 8-Expression der CD8⁺ T-Zellen (B) und die Bindung der Tetramere K^b/ova257 und D^b/gp33 durch CD8⁺ T-Zellen (C). Nummern geben die Prozente positiver Zellen an. Histogramme zeigen die Expressionshöhe von V β 5 und V β 8 (D) und K^b/ova257 und D^b/gp33 (E) auf Stg bzw. Dtg CD8⁺ T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus mindestens 3 Experimenten.

Peptidstimulation (Abb. 13A). P14 Stg-T-Zellen (95%) proliferierten als Antwort auf die Zugabe von gp33 und nicht nach Inkubation mit ova257 Peptid. Dtg-T-Zellen teilten sich nach Stimulation mit einem der beiden Peptide (91 bzw. 94%). Dies zeigt, dass sowohl der OT-I als auch der P14 TCR die Proliferation in Dtg-T-Zellen induzieren kann. Sowohl Stg als auch Dtg CD8⁺ T-Zellen proliferierten als Antwort auf die Mischung von ova257 und gp33 Peptid, aber nicht nach Inkubation in Medium allein.

Dem Nachweis der Aktivierung von T-Zellen dient neben der Messung der Proliferation die Analyse der Produktion von Zytokinen. Deshalb untersuchten wir die Fähigkeit von Stg- und Dtg-T-Zellen, IFN γ *in vitro* als Antwort auf spezifische Peptidstimulation zu produzieren. Hierzu wurden Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen, wie zuvor, mit Peptid stimuliert und nach 48 h mit mAK, die gegen CD8 und IFN γ gerichtet waren, gefärbt. OT-I (61%) und P14 Stg-T-Zellen (75%) waren IFN γ -positiv nach Stimulation mit ova257 bzw. gp33 Peptid (Abb. 13B). Weder OT-I noch P14 T-Zellen produzierten unspezifisch IFN γ als Antwort auf die Zugabe von gp33 bzw. ova257 Peptid. OT-I/P14 Dtg-T-Zellen waren IFN γ -positiv nach Kultivierung mit einem der beiden Peptide, wobei weniger Dtg-T-Zellen auf gp33 (60%) als auf ova257 (76%) reagierten, indizierend, dass OT-I Dual-TCR-T-Zellen von Dtg Mäusen kein IFN γ als Antwort auf die Zugabe von gp33 produzieren. Die Inkubation mit der Peptidmischung aus ova257 und gp33 führte zu IFN γ -Produktion von OT-I (63%) und P14 Stg (70%) als auch von Dtg-T-Zellen (77%), während keine IFN γ -positiven T-Zellen nach Kultivierung in Abwesenheit von Peptid detektiert wurden. Diese Daten zeigen, dass Dual-TCR-T-Zellen durch jeweils eines der beiden Peptide zu Proliferation und IFN γ -Produktion angeregt werden können.

5.3 OT-I/P14 Dtg-T-Zellen reduzieren überwiegend die Expression des peptidstimulierten TCR während sie die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen erhöhen

Ein Kennzeichen der Aktivierung von T-Zellen ist die Herabmodulation der TCR-Expression (103-105). Um zu analysieren, ob die Bindung nur eines Liganden an Dual-TCR-T-Zellen ausschließlich die Expressionshöhe des peptidstimulierten TCR beeinflusst oder ob die Expressionsdichte des nicht genutzten TCR ebenso abnimmt, wurden Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen, wie zuvor, mit Peptid stimuliert. Die TCR-Expressionshöhe wurde 18 h später nach Färbung mit mAK, die gegen CD8, V α 5 und V α 8 gerichtet waren, analysiert.

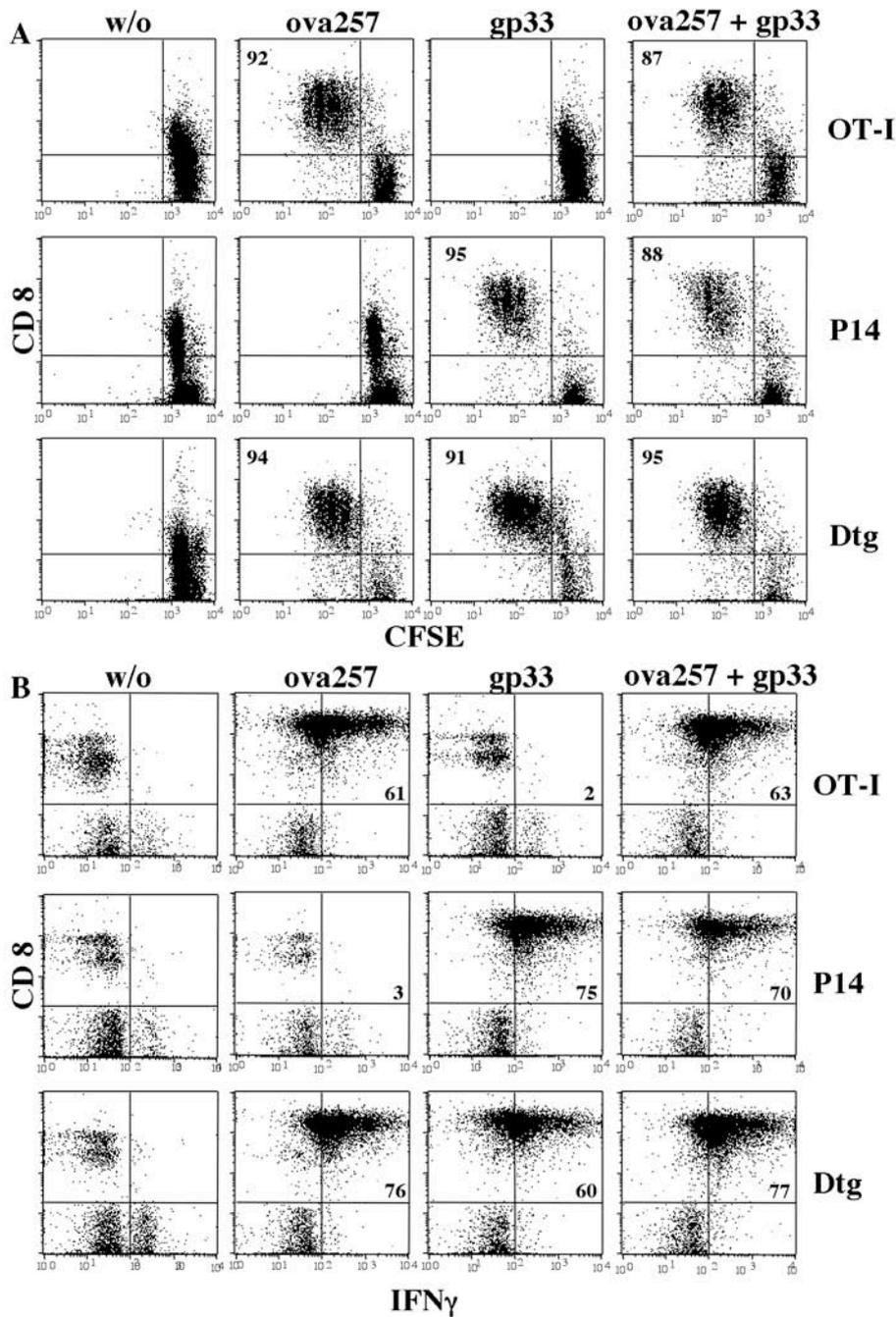


Abb. 13: OT-I/P14 Dtg-T-Zellen proliferieren und produzieren IFN γ als Antwort auf die Zugabe von beiden Peptidantigenen. **A**, Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden mit CFSE markiert, in Anwesenheit von 1 μ M ova257, gp33, einer Mischung von je 1 μ M ova257 und gp33 oder in Medium allein (w/o) kultiviert und nach 72 h mit mAK, die gegen CD8 gerichtet waren, gefärbt. Die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz von CD8⁺ T-Zellen wurde mittels DFZ analysiert. Die Ziffern geben die Prozente proliferierender CD8⁺ T-Zellen an. **B**, Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden, wie in (A) beschrieben, mit Peptid stimuliert und nach 48 h mit mAK, die gegen CD8 und IFN γ gerichtet waren, gefärbt und mittels DFZ analysiert. Die Ziffern geben die Prozente der CD8⁺ T-Zellen an, die positiv für intrazelluläres IFN γ gefärbt waren. Je ein Experiment aus drei Experimenten mit ähnlichen Resultaten ist gezeigt.

Parallel dazu wurden die K^b/ova257 und D^b/gp33 Tetramerbindungseigenschaften der CD8⁺ T-Zellen nach Färbung mit mAK, die gegen CD8 gerichtet waren, untersucht. Einzel- und Dual-TCR-T-Zellen modulierten beide TCR nach Inkubation mit der Mischung aus ova257 und gp33 Peptiden herunter, während die ursprüngliche TCR-Expressionshöhe erhalten blieb, wenn die Zellen in Medium allein kultiviert wurden (Abb. 14A). Die TCR auf OT-I T-Zellen wurden nur nach Inkubation mit ova257, aber nicht nach Inkubation mit gp33 Peptid, herabmoduliert. Entsprechend reduzierte sich die TCR-Expression auf P14 T-Zellen nur nach Inkubation mit gp33, während ova257 keinen Einfluss auf die TCR-Dichte hatte. Dual-TCR-T-Zellen modulierten die OT-I TCR als Antwort auf die Zugabe von ova257 Peptid herab, während gp33 Peptidstimulation zu einer leichten Zunahme der OT-I TCR-Expression führte. Die V α 8-Expression auf Dual-TCR-T-Zellen reduzierte sich nach Inkubation mit gp33, blieb aber auf ursprünglicher Expressionshöhe, wenn ova257 zugefügt wurde. Vergleichbare Ergebnisse ergaben die Analysen der TCR-Herabmodulation mittels Färbung der Zellen mit den Tetrameren und CD8-mAK (Abb. 14B). Allerdings indizierte die Intensität der D^b/gp33 Tetramerfärbung der Dual-TCR-T-Zellen nach Inkubation mit ova257 Peptid eine leichte Reduzierung der P14-TCR-Dichte. Letzteres zeigt, dass der P14-TCR partiell durch die Stimulation mit ova257 Peptid beeinflusst wird.

Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Produktion von IFN γ , welches die Erhöhung der MHC-Klasse-I-Expression induziert. Deshalb untersuchten wir die Höhe der H-2D^b und H-2K^b Expression 18 h nach Peptidstimulation der Milzzellen mittels Färbung mit mAK, die gegen CD8, H-2D^b und H-2K^b gerichtet waren. T-Zellen, die nur in Medium kultiviert wurden, zeigten eine geringe MHC-I-Expression (Abb. 14C). OT-I als auch P14 Stg-T-Zellen erhöhten die Expression der MHC-I-Moleküle nach ova257 bzw. gp33 Peptidstimulation oder als Antwort auf den Mix beider Peptide in antigenspezifischer Weise. Die MHC-Klasse-I-Hochregulation in Dtg-T-Zellen wurde durch beide Peptide induziert, unabhängig davon, ob sie separat oder in Kombination zugefügt wurden.

Diese Daten zeigen, dass OT-I und P14 Stg-T-Zellen ihre TCR nur nach Kontakt mit dem spezifischen Peptid herabmodulieren. Dtg-T-Zellen zeigen überwiegend eine Reduzierung der TCR, die mit ihren spezifischen Liganden stimuliert wurden, während korrespondierende ligandenfreie TCR nur geringfügig in ihrer Expressionshöhe beeinflusst sind. Parallel dazu erhöht sich die MHC-Klasse-I-Expression nach Inkubation von Einzel- und Dual-TCR-T-Zellen mit Peptid in antigenspezifischer Weise.

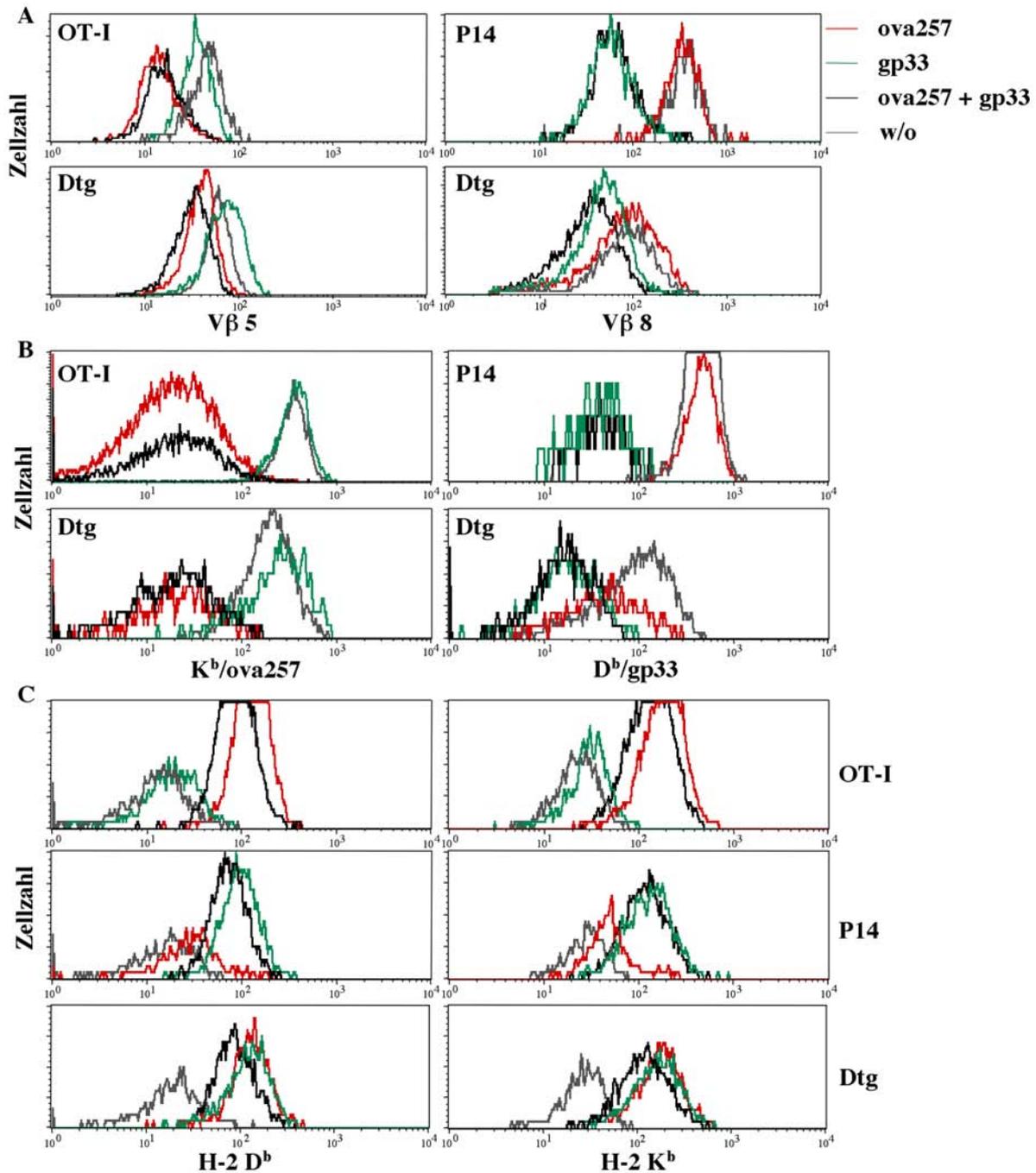


Abb. 14: OT-I/P14 Dtg-T-Zellen reduzieren überwiegend die Expression des peptidstimulierten TCR, während sie die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen erhöhen. Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden, wie in Abb. 13, mit Peptiden stimuliert oder in Medium allein kultiviert (w/o). Die TCR- und MHC-Klasse-I-Expressionshöhe wurde parallel nach 18 h mittels Färbung mit mAK oder Tetrameren durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die $V\beta 5$ - und $V\beta 8$ - (A), $K^b/ova257$ - und $D^b/gp33$ -Tetramer- (B) und H-2 D^b - und H-2 K^b - (C) Färbung von $CD8^+$ T-Zellen. Zur Analyse der TCR-Expression auf Dual-TCR-T-Zellen wurde die OT-I Einzel-TCR-Population (11-19%) ausgeschlossen. Ein Experiment von 3 Experimenten mit ähnlichen Resultaten ist gezeigt.

5.4 OT-I und P14 Stg- und OT-I/P14 Dtg-T-Zellen zeigen ähnliche Sensitivität gegenüber beiden Peptiden

Die Expressionshöhe der OT-I-TCR auf Dtg- und Stg-T-Zellen ist ähnlich, während die Dichte der P14-TCR auf Dtg-T-Zellen im Vergleich zu der auf Stg P14 T-Zellen reduziert ist. Um zu analysieren, ob dies einen Einfluss auf die Peptidsensitivität hat, wurden Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen mit abnehmenden Konzentrationen der entsprechenden Peptide inkubiert. Der Einfluss unterschiedlicher Peptidkonzentrationen auf die TCR-Herabmodulation, IFN γ -Produktion und Proliferation wurde nach 18, 48 bzw. 72 h gemessen und als Prozentsatz der ursprünglichen TCR-Expressionshöhe (bestimmt auf T-Zellen nach Inkubation in Medium allein) bzw. als Prozentsatz der maximalen IFN γ -Produktion und Proliferation (bestimmt nach Inkubation mit 1 μ M des spezifischen Peptids) angegeben. Die minimale Konzentration der spezifischen Peptide, die notwendig war, um TCR-Herabmodulation zu induzieren, betrug in OT-I T-Zellen 10^{-4} und in P14 T-Zellen 10^{-2} μ M, was auf eine geringere Affinität des P14 TCR hindeutet (Abb. 15A). Die minimale Konzentration von ova257, die erforderlich war, um die OT-I-TCR-Herabmodulation in Dual-TCR-T-Zellen zu induzieren, betrug 10^{-4} μ M, während 10^{-2} μ M des gp33-Peptids notwendig waren, um die P14-TCR-Herabmodulation in Dual-TCR-T-Zellen hervorzurufen. Weder Einzel- noch Dual-TCR-T-Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied in der TCR-Herabmodulation nach Stimulation mit einem spezifischen Peptid allein oder der Stimulation mit der Mischung von ova257 und gp33 Peptid. Die Inkubation von Stg- und Dtg-T-Zellen in Medium allein oder in Anwesenheit des K^b-bindenden Kontrollpeptides SIY führte nicht zu einer TCR-Herabmodulation. Um die IFN γ -Produktion von OT-I und P14 Stg-T-Zellen zu induzieren, war ein Minimum von 10^{-6} μ M bzw. 10^{-4} μ M des spezifischen Peptides notwendig (Abb. 15B), erneut indizierend, dass P14 TCR im Vergleich zu OT-I TCR eine geringere Peptidaffinität haben. In Korrelation damit waren Dtg-T-Zellen nach Stimulation mit einem Minimum von 10^{-6} μ M ova257 oder der Mischung von ova257 und gp33 IFN γ -positiv. Mindestens 10^{-4} μ M des gp33-Peptides waren notwendig, um die IFN γ -Produktion von Dtg-T-Zellen zu induzieren. Stg- und Dtg-T-Zellen, die in Medium allein oder in Anwesenheit des K^b-bindenden Peptides SIY kultiviert wurden, waren IFN γ -negativ. Die minimale Menge des ova257 Peptides, die notwendig war, um die Proliferation der T-Zellen zu induzieren, war vergleichbar in OT-I und Dtg-T-Zellen und betrug 10^{-6} μ M (Abb. 15C), während 10^{-4} μ M gp33 notwendig waren, um die Proliferation von P14 und Dtg-T-Zellen zu induzieren. Wir

schließen daraus, dass sich Stg- und Dtg-T-Zellen *in vitro* nicht signifikant in ihrer Peptidsensitivität unterscheiden.

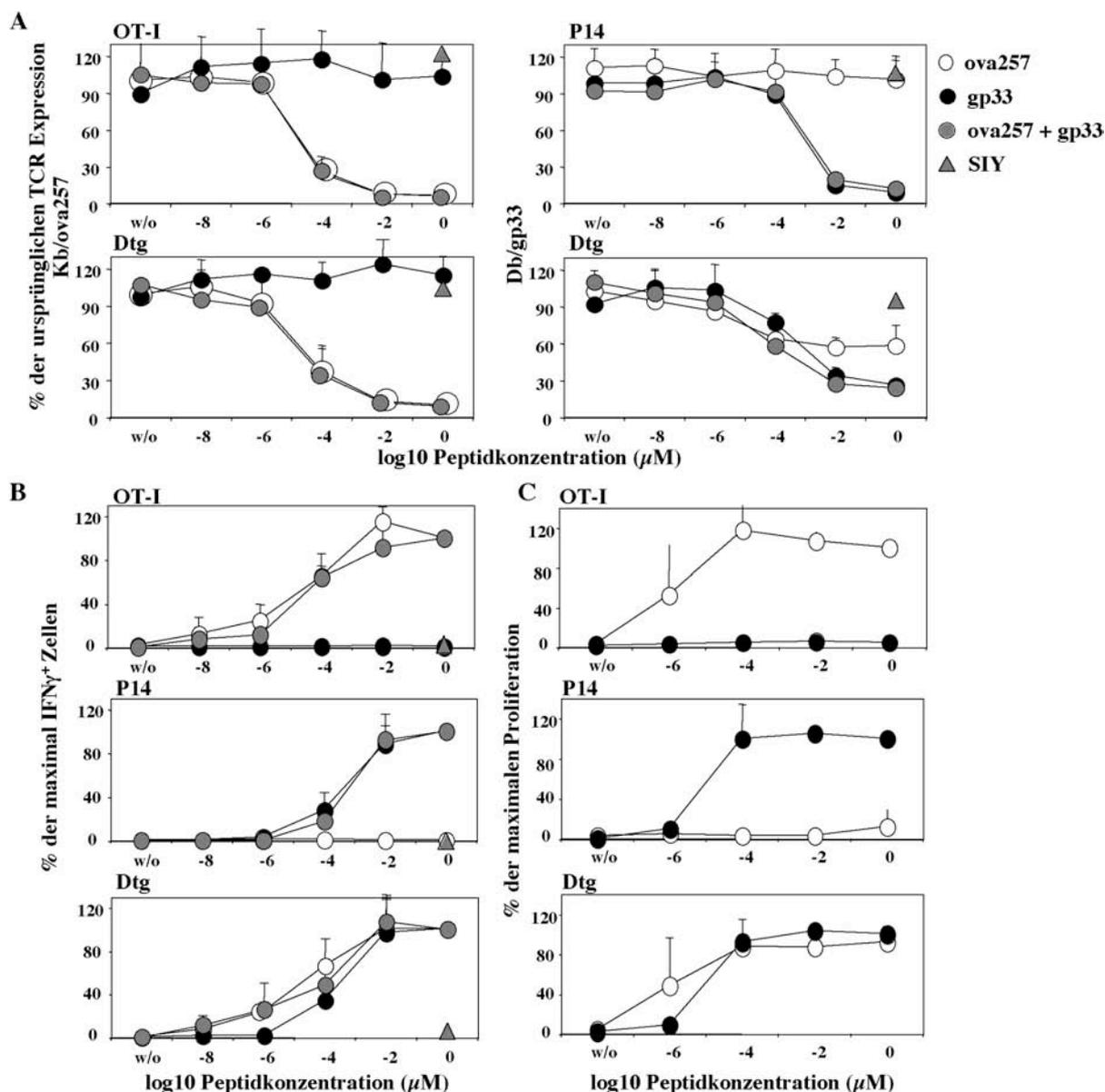


Abb. 15: Die Peptidsensitivität von Einzel- und Dual-TCR-T-Zellen ist ähnlich. Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden in Anwesenheit von abnehmenden Konzentrationen der angegebenen Peptide oder in Medium allein (w/o) kultiviert. **A**, Die Höhe der TCR-Expression wurde 18 h nach Peptidstimulation, wie in Abb. 14B beschrieben, gemessen. Gezeigt sind die Prozentsätze der ursprünglichen mittleren Fluoreszenzintensität (gMFI) (nach Inkubation in Medium allein) als kombinierte Resultate aus drei individuellen Experimenten (einschließlich des in Abb. 14B gezeigten Experimentes). **B**, Die IFN- γ -Produktion der gleichen Milzzellpopulationen (wie in Abb. 15A) wurde nach 48 h, wie in Abb. 13B beschrieben, analysiert. Die Prozentsätze der maximalen IFN- γ -Produktion der Milzzellen (bestimmt nach Inkubation mit 1 μ M des spezifischen Peptides) sind als kombinierte Resultate aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt (einschließlich des in Abb. 13B gezeigten Experimentes). **C**, Die Verdünnung der CFSE-Fluoreszenz wurde nach 72 h, wie in Abb. 13A beschrieben, analysiert. Gezeigt sind die Prozentsätze der maximalen Proliferation der Milzzellen

(bestimmt nach Inkubation mit 1 μ M des spezifischen Peptides) als kombinierte Resultate aus zwei (OT-I und P14) oder vier individuellen Milzzellpopulationen (Dtg) (einschließlich des in Abb. 13A gezeigten Experimentes).

5.5 OT-I und P14 TCR können hybride Heterodimere unbekannter Spezifität bilden

5.5.1 P14/OT-I α -T-Zellen exprimieren P14 α /OT-I α -Heterodimere unbekannter Spezifität

In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass Dual-TCR-T-Zellen bispezifisch sind und ähnliche Peptidsensitivität wie Stg-T-Zellen der gleichen Spezifität haben. Trotzdem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Dual-TCR-T-Zellen zusätzlich hybride TCR-Heterodimere unbekannter Spezifität exprimieren. Um herauszufinden, ob die TCR-Ketten der OT-I und P14 TCR hybride Heterodimere bilden können, wurden P14- und OT-I α - ($\alpha\alpha$) transgene Mäuse untereinander verpaart. Die Anwesenheit endogener TCR war, wie schon bei OT-I/P14 Dtg Mäusen, durch das Fehlen des Rag1-Gens ausgeschlossen. Die Anwesenheit der OT-I α - bzw. P14 α -TCR-Kettengene wurde durch PCR mit Hilfe der Primerpaare V α 5 bzw. P14 α analysiert, bei der aus Mäuseschwänzen isolierte genomische DNA als Matrize diente. OT-I- und OT-I α -transgene Mäuse enthielten die OT-I α -, aber nicht die P14 α -Kettengene (Abb. 16A). Vice versa wurden in P14-transgenen Mäusen die P14 α -, aber nicht die OT-I α -Kettengene nachgewiesen. Dtg als auch P14/OT-I α -transgene Mäuse enthielten sowohl OT-I α - als auch P14 α -Kettengene. Primer-Dimere sind als schwache Banden in den Proben zu erkennen, in denen keine TCR-Kettengene amplifiziert werden konnten. OT-I (99%) und P14 T-Zellen (99%) exprimierten ausschließlich V α 5- bzw. V α 8-TCR-Ketten (Abb. 16B). OT-I/P14 Dtg Mäuse exprimierten beide TCR α -Ketten auf 91% der T-Zellen. In OT-I α -transgenen Mäusen konnten aufgrund der Abwesenheit der TCR α -Ketten keine CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). P14/OT-I α -transgene Mäuse exprimierten beide TCR α -Ketten auf 100% der T-Zellen, indizierend, dass in Abwesenheit der OT-I α -Ketten P14 α /OT-I α -Heterodimere auf der Oberfläche dieser T-Zellen exprimiert werden. Die Färbung mit rekombinanten Tetrameren zeigt, dass OT-I (99%) und P14 T-Zellen (100%) ausschließlich K^b/ova257 bzw. D^b/gp33 Tetramere banden (Abb. 16C). Dtg-T-Zellen (80%) waren mit beiden Tetrameren gefärbt. Im Gegensatz dazu banden P14/OT-I α T-Zellen (99%) ausschließlich D^b/gp33 Peptid/MHC-Komplexe. Letzteres weist darauf hin, dass die ova257-Peptidspezifität von der zusätzlichen Anwesenheit der OT-I-TCR α -Ketten abhängt. Die Färbung peripherer Lymphozyten zeigt, dass die Expressionshöhe von CD3 auf

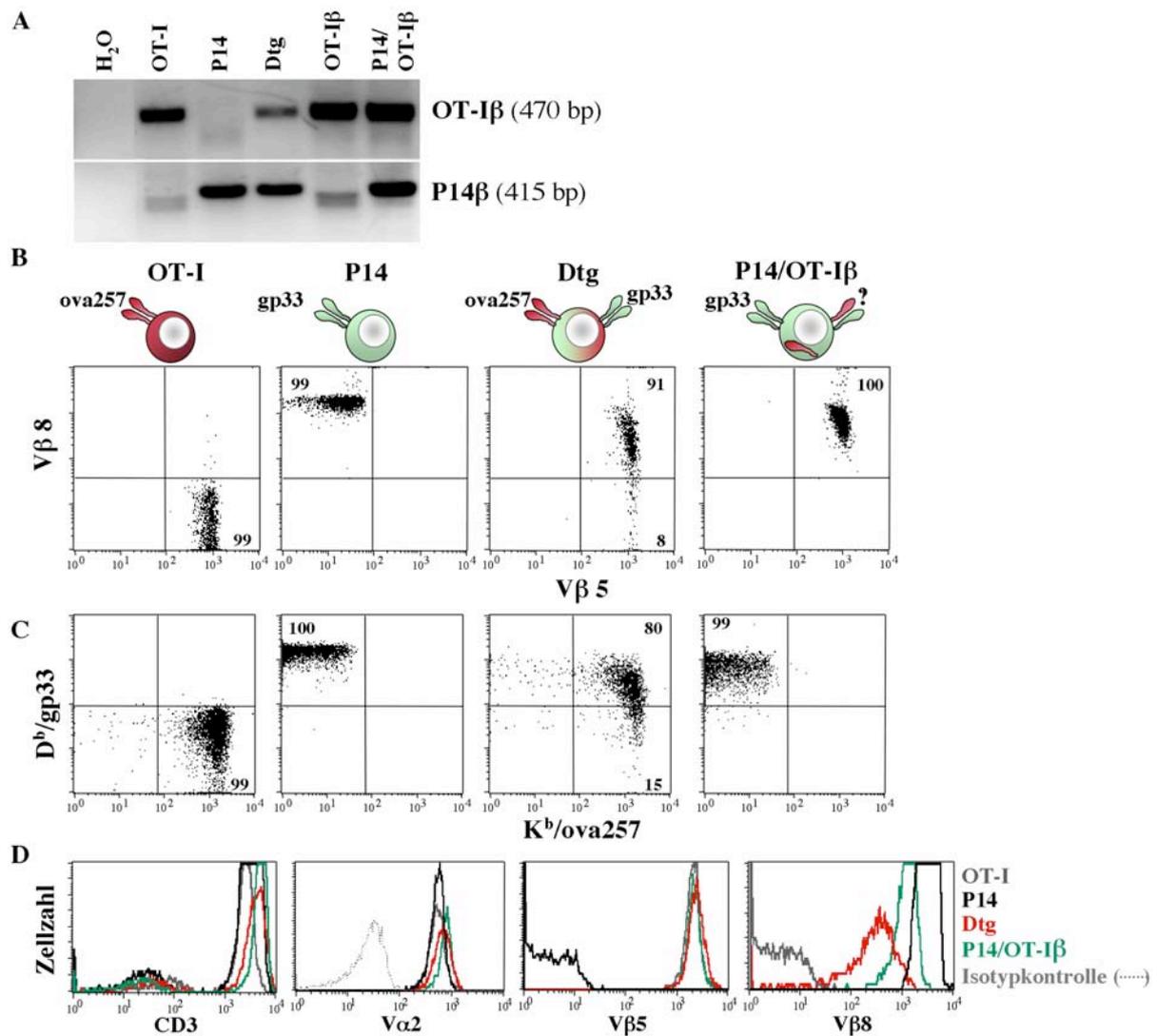


Abb. 16: P14/OT-I β T-Zellen exprimieren beide TCR β -Ketten, haben aber nur gp33-Spezifität. OT-I, P14, Dtg, OT-I β und P14/OT-I β Mäuse wurden mittels PCR typisiert, bei der aus Mäuseschwänzen isolierte genomische DNA als Matrize diente und OT-I β - bzw. P14 β -spezifische Primer genutzt wurden (**A**). Die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen der Mäuse (schematisch dargestellt) wurde nach Färbung mit mAK, die gegen CD8, V β 5 und V β 8 gerichtet waren (**B**) bzw. nach Färbung mit Anti-CD8-mAK und den Tetrameren K^b/ova257 und D^b/gp33 (**C**) durchgeführt. Ziffern geben die Prozente positiver Zellen in der CD8-T-Zell-Population an. Histogramme zeigen die Expressionshöhe von CD3 auf peripheren Lymphozyten sowie von V α 2, V β 5 bzw. V β 8 auf CD3⁺ peripheren T-Zellen der Mäuse (**D**). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel aus mindestens zwei Experimenten.

OT-I/P14 Dtg und P14/OT-I β Lymphozyten im Vergleich zu der auf OT-I und P14 Stg Lymphozyten leicht erhöht war (Abb. 16D). Ebenso war die Dichte der V α 2-Ketten auf Dtg und P14/OT-I β T-Zellen im Vergleich zu der auf Stg-T-Zellen leicht erhöht. Die Expressionshöhe der V β 5-Kette auf P14/OT-I β T-Zellen war vergleichbar mit der auf Stg

OT-I bzw. Dtg-T-Zellen. Die Höhe der V α 8-Expression war auf P14/OT-I β T-Zellen im Vergleich zu der auf P14 Stg-T-Zellen reduziert und im Vergleich zu der auf Dtg-T-Zellen erhöht. P14/OT-I β und Dtg-T-Zellen unterschieden sich kaum in der Dichte der V α 2-Expression. P14/OT-I β T-Zellen exprimierten CD8-Korezeptoren, waren aber CD4 $^+$ (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass P14/OT-I β T-Zellen P14 α /OT-I β -Heterodimere exprimieren, dass diese jedoch keine ova257 Peptidspezifität haben.

5.5.2 P14/OT-I β T-Zellen haben ähnliche Sensitivität gegenüber gp33 Peptiden wie P14 Stg-T-Zellen

Um die Funktionalität der P14/OT-I β T-Zellen im Vergleich zu Stg- und Dtg-T-Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurden Milzzellen von OT-I, P14, Dtg und P14/OT-I β Mäusen mit abnehmenden Konzentrationen der entsprechenden Peptide inkubiert und nach 48 h mit mAK, die gegen CD8 und IFN γ gerichtet waren, gefärbt. Der Prozentsatz der maximalen IFN γ -Produktion (bestimmt nach Inkubation mit 1 μ M des spezifischen Peptides) ist angegeben (Abb. 17). Die Inkubation mit ova257 Peptid führte zu IFN γ -Produktion von OT-I und Dtg-T-Zellen, während P14 und P14/OT-I β T-Zellen nach ova257-Peptidstimulation IFN γ -negativ blieben. P14, Dtg und P14/OT-I β T-Zellen produzierten IFN γ als Antwort auf ein Minimum von 10^{-4} μ M des gp33 Peptides. Stg, Dtg bzw. P14/OT-I β T-Zellen, die in Medium allein oder in Anwesenheit des K b -bindenden Peptides SIY kultiviert worden waren, waren IFN γ -negativ. Diese Daten zeigen, dass P14/OT-I β T-Zellen nicht ova257-spezifisch sind und sich in ihrer gp33-Peptidsensitivität nicht signifikant von P14 Stg- bzw. Dtg-T-Zellen unterscheiden.

5.5.3 P14 α -transduzierte OT-I T-Zellen können OT-I β /P14 α -Heterodimere unbekannter Spezifität exprimieren

In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die OT-I β -Kette in P14/OT-I β T-Zellen Heterodimere mit der P14 α -Kette bilden kann. Um vice versa zu untersuchen, ob die β -Kette des P14 TCR zusammen mit der OT-I β -Kette exprimiert werden kann, wurden OT-I T-Zellen (wie zuvor Rag1 $^{-/-}$) mit P14 α -, P14 β - bzw. mit der Kombination aus P14 α - und P14 β -TCR-Ketten-kodierenden retroviralen Vektoren transduziert. Dazu wurde zunächst die P14 α - bzw. P14 β -Ketten cDNA in den retroviralen Expressionsvektor MP71-PRE (MP71) (17, 100) kloniert. Virus-ZKÜ wurden von GP+E86 Verpackungszellen, die mit den Vektoren

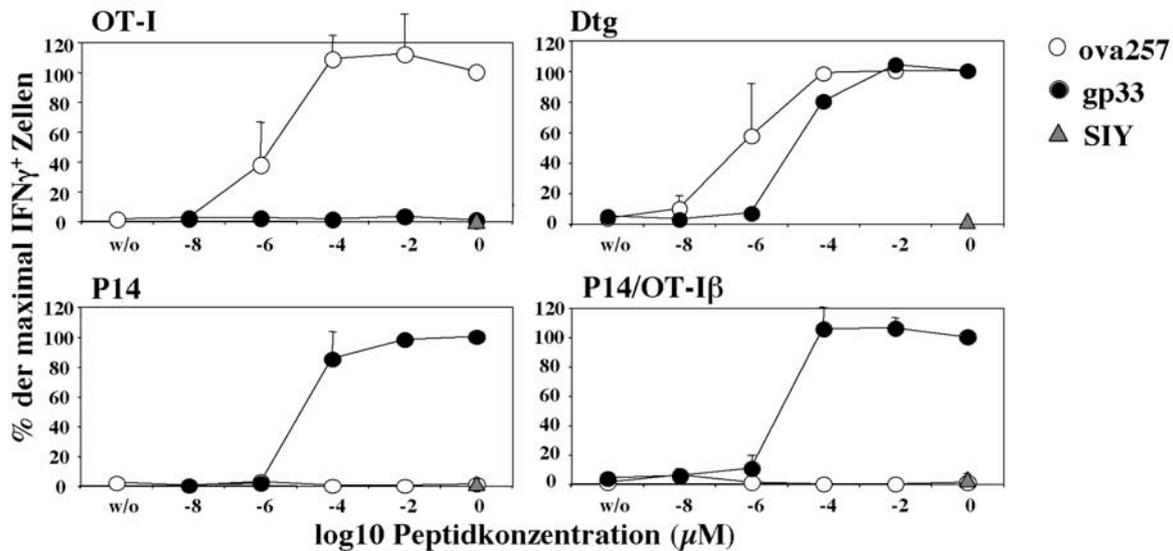


Abb. 17: Die Peptidsensitivität von P14 Stg, Dtg sowie P14/OT-I β T-Zellen ist ähnlich. Milzzellen von OT-I, P14, Dtg und P14/OT-I β Mäusen wurden in Anwesenheit von abnehmenden Konzentrationen der angegebenen Peptide oder in Medium allein (w/o) kultiviert. Die IFN γ -Produktion der Milzzellen wurde nach 48 h, wie in Abb. 13B beschrieben, analysiert. Die Prozentsätze der maximalen IFN γ -Produktion der Milzzellen (bestimmt nach Inkubation mit 1 μ M des spezifischen Peptides) sind als kombinierte Resultate aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. Vergleichbare Resultate wurden in vier weiteren Experimenten, in denen TCR-Herabmodulation und Proliferation analysiert wurde, erzielt.

MP71-P14 β bzw. MP71-P14 α transfiziert waren, generiert. MP71-P14 α - bzw. MP71-P14 β -Virus-ZKÜ wurden genutzt, um für 24 h mit ova257-Peptid stimulierte primäre OT-I T-Zellen zu transduzieren. Die Oberflächenexpression der TCR-Ketten wurde mittels DFZ 5 Tage nach Transduktion analysiert. 99% der untransduzierten bzw. P14 α -transduzierten OT-I T-Zellen exprimierten ausschließlich die OT-I-V α 5-Ketten (Abb. 18A). Die Transduktion mit P14 α -kodierenden Vektoren führte zur Expression der P14 α -Ketten in 16% der primären OT-I T-Zellen, indizierend, dass in Abwesenheit der P14 α -Kette OT-I α /P14 α -Heterodimere exprimiert werden. Nach P14 α / β -Kotransduktion exprimierten 16% der OT-I T-Zellen P14-V α 8-Ketten. Die P14-V α 8-Ketten wurden in 14% der P14 α - bzw. P14 α / β -transduzierten OT-I T-Zellen simultan mit OT-I-V α 5-Ketten auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert. Nicht transduzierte bzw. P14 α - oder P14 β -transduzierte OT-I T-Zellen banden ausschließlich K^b/ova257 Tetramere (Abb. 18B). 7% der OT-I T-Zellen waren nach P14 α / β -Kotransduktion D^b/gp33 Tetramer positiv. Dabei banden 5% der P14 α / β -transduzierten OT-I T-Zellen beide Tetramere simultan. Die OT-I TCR-Expression war auf den hier untersuchten peptidstimulierten OT-I T-Zellen im Vergleich zu der auf frisch isolierten T-Zellen

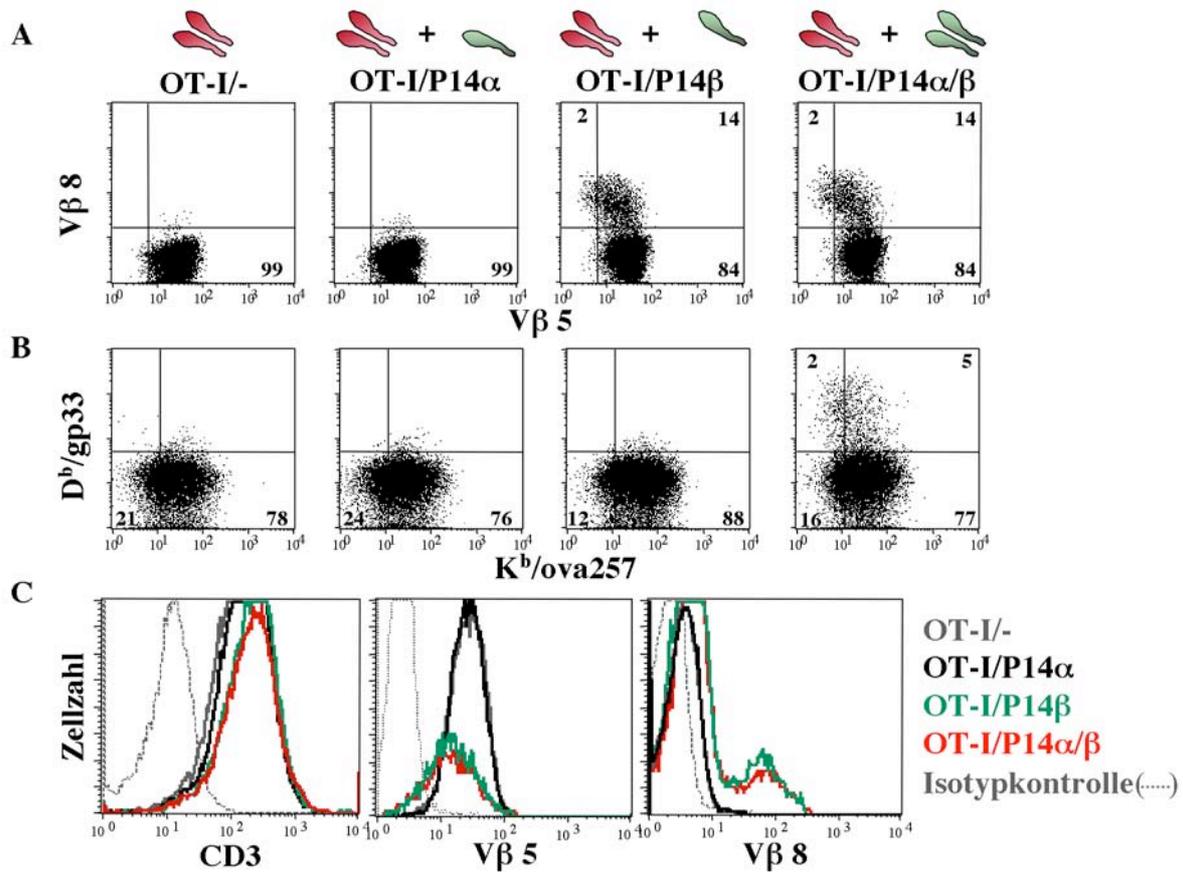


Abb. 18: P14 β -transduzierte OT-I T-Zellen können V β 8-Ketten exprimieren, haben aber nur ova257-Spezifität. Für 24 h mit ova257 Peptid stimulierte OT-I Milzzellen wurden mit MP71-P14 α , MP71-P14 β bzw. einer Kombination aus MP71-P14 α - und MP71-P14 β -Vektoren transduziert (TCR sind schematisch dargestellt) und 5 Tage nach Transduktion mittels DFZ analysiert. Als Kontrolle dienten nicht transduzierte Zellen (-). Die Titer betragen ca. 2×10^6 (P14 α) bzw. 3×10^6 (P14 β) infektiöse Partikel/ml. Die Zellen wurden mit mAK, die gegen CD3, V β 5 und V β 8 gerichtet waren (A, C) bzw. mit Anti-CD3-mAK und den Tetrameren K^b/ova257 und D^b/gp33, gefärbt (B). A und B zeigen nur CD3⁺ T-Zellen. Histogramme zeigen die Expressionshöhe von CD3 auf Lymphozyten, von V β 5 auf V β 8⁺/CD3⁺ T-Zellen bzw. von V β 8 auf CD3⁺ T-Zellen (C). Ziffern geben die Prozente positiver Zellen innerhalb der CD3-T-Zell-Population an. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus 2 Experimenten.

herabreguliert. Die Höhe der CD3-Expression war auf nicht transduzierten, P14 α -, P14 β - bzw. P14 α/β -transduzierten OT-I T-Zellen vergleichbar (Abb. 18C). Im Vergleich zu P14 α - bzw. nicht transduzierten OT-I T-Zellen exprimierten P14 β - und P14 α/β -transduzierte OT-I T-Zellen geringfügig reduzierte V β 5-Level, indizierend, dass die zusätzliche Expression der P14 β -Kette zu einer Verminderung der OT-I α -Kettendichte führte. Die V β 8-Expressionshöhe auf P14 α - bzw. P14 α/β -transduzierten OT-I T-Zellen war vergleichbar. Diese Daten zeigen, dass in Abwesenheit von P14 α -TCR-Ketten OT-I α /P14 β -Heterodimere auf der Oberfläche

von P14 \square -transduzierten OT-I T-Zellen exprimiert werden können, dass diese jedoch keine gp33-Peptidspezifität haben.

5.6 Die Stimulation von OT-I/P14 Dtg-T-Zellen über einen TCR ist ausreichend, um das Wachstum antigenexprimierender Tumoren über beide TCR in Rag1^{-/-} Mäusen zu inhibieren

Um zu untersuchen, ob die Stimulation der OT-I/P14 Dtg-T-Zellen über einen TCR ausreicht, um Effektorfunktionen über beide TCR zu induzieren, wurde die Fähigkeit von ova257- oder gp33-stimulierten Dtg-T-Zellen, das Wachstum von B16-ova und B16-gp33 Melanom-Zellen in Rag1^{-/-} Mäusen zu unterdrücken, analysiert. T-Zellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden für 72 h in antigenspezifischer Weise mit ova257- oder gp33-Peptiden *in vitro* stimuliert. 4x10⁶ ova257-stimulierte T-Zellen von OT-I bzw. Dtg Mäusen oder gp33-stimulierte T-Zellen von P14 bzw. Dtg Mäusen wurden in Rag1^{-/-} Mäuse *iv.* injiziert, denen einen Tag zuvor kontralateral 5x10⁴ B16-ova und B16-gp33 Tumorzellen *sc.* injiziert worden waren. In Mäusen, die keinen adoptiven T-Zelltransfer erhalten hatten, wuchsen beide Tumoren mit ähnlicher Kinetik aus (Abb. 19). Der adoptive Transfer von ova257-stimulierten OT-I T-Zellen unterdrückte das Wachstum der B16-ova, aber nicht der B16-gp33 Tumoren. Mäuse, die P14 T_E erhalten hatten, unterdrückten das Wachstum der B16-gp33, aber nicht der B16-ova Tumoren. Ova257- als auch gp33-stimulierte Dtg-T-Zellen unterdrückten das Wachstum von B16-ova und B16-gp33 Tumoren. Jedoch war die Antwort gegen B16-gp33 Tumoren weniger effizient, da nach einer Latenzperiode B16-gp33, aber nicht B16-ova Tumoren auswuchsen. 4 von 7 reisolierten B16-gp33 Tumoren aus Rag1^{-/-} Mäusen konnten naive P14 T-Zellen *in vitro* nicht mehr zur Produktion von IFN \square anregen (Daten nicht gezeigt), was wahrscheinlich auf den Verlust der Antigenexpression zurückzuführen ist. Dennoch demonstrieren diese Daten, dass OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen das Wachstum von Ova- und gp33 exprimierenden B16-Tumoren in Rag1^{-/-} Mäusen nach Stimulation über den OT-I oder den P14 TCR inhibieren können.

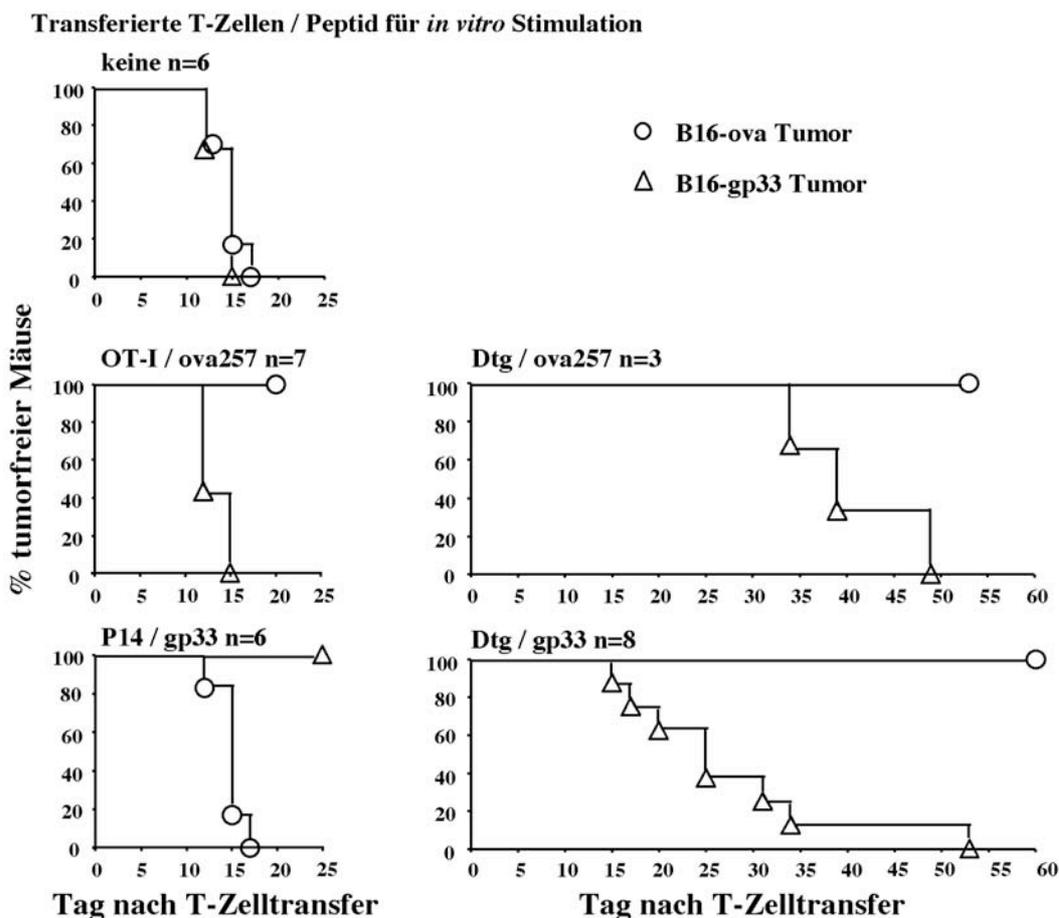


Abb. 19: Die Stimulation über einen TCR ist ausreichend, um das Wachstum von Tumoren über beide TCR in $Rag1^{-/-}$ Mäusen zu inhibieren. Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden *in vitro* in Anwesenheit der angegebenen Peptide für 72 h inkubiert. 4×10^6 T_E wurden adoptiv in $Rag1^{-/-}$ Mäuse transferiert, denen einen Tag zuvor *sc.* 5×10^4 B16-ova und 5×10^4 B16-gp33 Melanom-Zellen kontralateral injiziert worden waren. Gezeigt ist der Prozentsatz tumorfreier Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach adoptivem T-Zelltransfer sowie die Menge der analysierten Mäuse. Ähnliche Resultate, wenn auch mit schwächerer Inhibition des Tumorwachstums, wurden in zwei weiteren Experimenten erzielt, in denen 2×10^6 T_E adoptiv in $Rag1^{-/-}$ Mäuse transferiert wurden, denen einen Tag zuvor 1×10^5 Melanom-Zellen, wie beschrieben, injiziert worden waren.

5.7 Reisolierter T-Zellen bewahren die Fähigkeit, IFN γ als Antwort auf beide Peptide zu produzieren

Um zu untersuchen, ob adoptiv transferierte Einzel- und Dual-TCR-T-Zellen in $Rag1^{-/-}$ Mäusen überlebten und ihre Funktionalität bewahrten, wurden Milzen der tumortragenden $Rag1^{-/-}$ Mäuse analysiert. Milz-Lymphozyten der Mäuse, denen T-Zellen transferiert worden waren, waren $CD8^+$ (zwischen 14 und 21%) (Abb. 20A), während Lymphozyten aus $Rag1^{-/-}$ Mäusen ohne T-Zelltransfer $CD8^-$ waren (Daten nicht gezeigt), indizierend, dass die adoptiv transferierten T-Zellen reisolieren konnten. Die Fähigkeit dieser $CD8^+$ Zellen, die

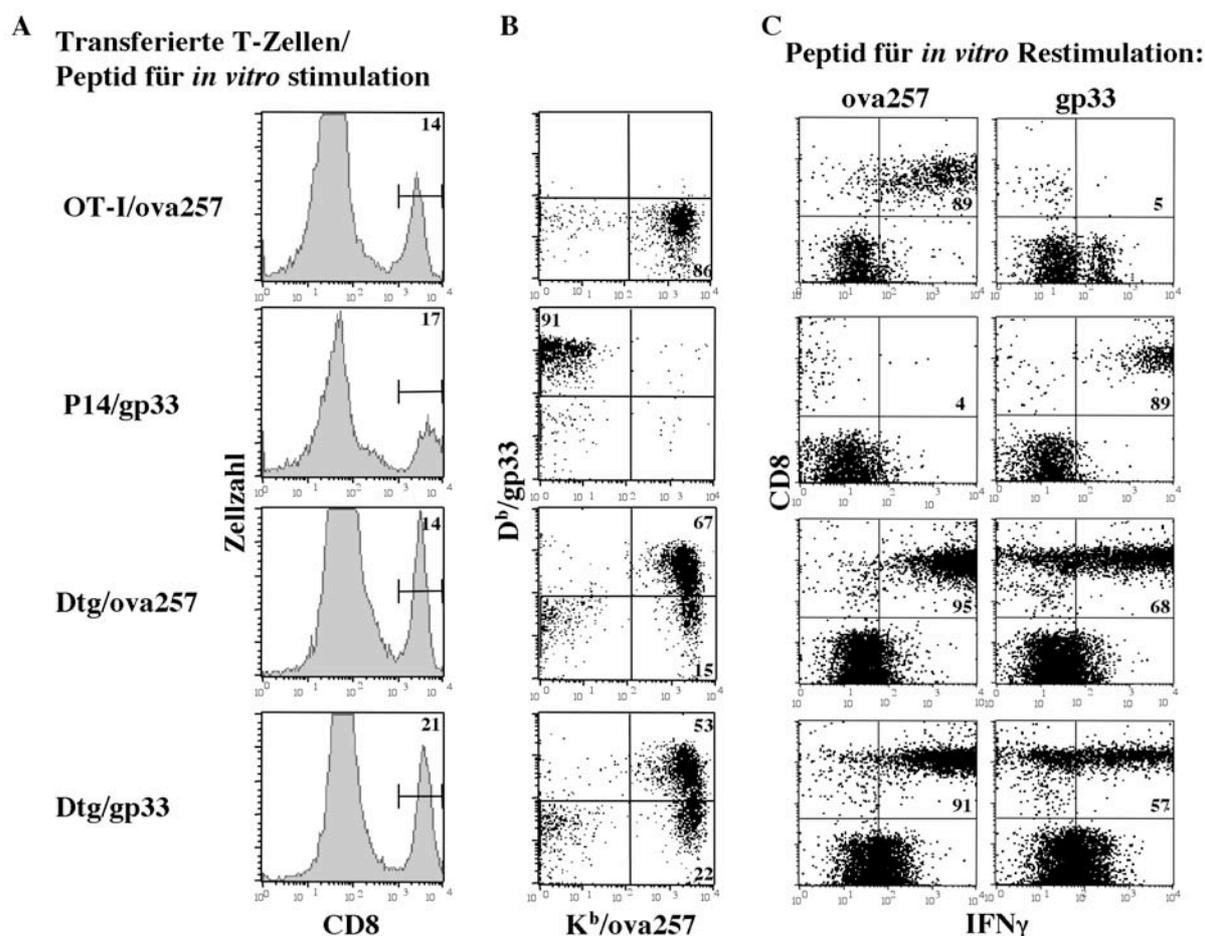


Abb. 20: Aus tumortragenden Rag1^{-/-} Mäusen reisolierte CD8⁺ T-Zellen produzieren IFN γ als Antwort auf spezifische Peptidstimulation. Milzzellen von tumortragenden Rag1^{-/-} Mäusen (gezeigt in Abb. 19) wurden zwischen Tag 17 und 60 nach adoptivem T-Zelltransfer isoliert und mittels DFZ nach Färbung mit Anti-CD8-mAK und den Tetrameren K^b/ova257 und D^b/gp33 analysiert. Gezeigt ist die CD8-Expression der Lymphozyten (A) und die Bindung der Tetramere K^b/ova257 und D^b/gp33 durch CD8⁺ T-Zellen (B). Ziffern geben den Prozentsatz positiver Zellen an. C, Die IFN γ -Produktion reisolierter Milzzellen (gezeigt in B) wurde, wie in Abb. 13B beschrieben, nach Übernachtkultivierung in Anwesenheit von 1 μ M der gezeigten Peptide analysiert. Ziffern geben den Prozentsatz der CD8⁺ T-Zellen an, die IFN γ waren. Ein repräsentatives Beispiel aus mindestens drei untersuchten Mäusen pro Gruppe ist gezeigt. Ähnliche Resultate wurden in einem weiteren Experiment, in dem Milzzellen von tumortragenden Rag1^{-/-} Mäusen, denen 10⁵ Melanom-Zellen injiziert und 2x10⁶ T_E, wie bereits beschrieben, adoptiv transferiert wurden, erzielt.

Tetramere H-2 K^b/ova257 und H-2 D^b/gp33 zu binden und IFN γ nach Übernacht-Kultivierung in Anwesenheit von 1 μ M ova257 oder gp33 zu produzieren, wurde analysiert. Reisolierte Einzel- als auch Dual-TCR-T-Zellen banden die Tetramere in antigenspezifischer Weise (Abb. 20B, ausschließlich CD8⁺ T-Zellen sind gezeigt). Eine kleine Population der CD8⁺ Milzzellen aus Rezipienten von Dtg T_E war Tetramer-negativ. Die Peptid-spezifische Stimulation der reisolierten Stg OT-I und P14 T-Zellen *in vitro* führte zu IFN γ -Produktion in

89% dieser Zellen (Abb. 20C). Außerdem antworteten reisolierte ova257- sowie gp33-stimulierte Dtg-T-Zellen auf erneute Stimulation mit ova257 bzw. gp33 Peptiden durch IFN γ -Produktion. Korrelierend mit der IFN γ -Produktion peptidstimulierter naiver Dtg-T-Zellen (Abb. 13B) wurden mehr IFN γ -positive Dual-TCR-T-Zellen nach Restimulation mit ova257 (91 - 95%) als mit gp33 (57 - 68%) detektiert. Weiterhin war die IFN γ -Antwort der verschiedenen reisolierten T-Zellen stärker als die IFN γ -Antwort peptidstimulierter naiver OT-I, P14 oder Dtg-T-Zellen.

Diese Daten demonstrieren, dass adoptiv transferierte Dtg-T-Zellen, wie auch Stg-T-Zellen, in tumortragenden Rag1^{-/-} Mäusen überleben und ihre Funktionalität, hier gemessen anhand ihrer Fähigkeit, IFN γ als Antwort auf spezifische Peptidstimulation *in vitro* zu produzieren, bewahren.

5.8 Die Stimulation von OT-I/P14 Dtg-T-Zellen über einen TCR ist ausreichend, um das Wachstum von B16-gp33 Tumoren in C57Bl/6 Mäusen zu inhibieren

Wie gezeigt wurde, können OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen, die über den OT-I bzw. P14 TCR stimuliert wurden, das Wachstum von Ova- und gp33-exprimierenden B16-Melanom-Tumoren in Rag1^{-/-} Mäusen inhibieren. Die adoptiv transferierten T-Zellen treffen in Rag1^{-/-} Mäusen auf Rezipienten ohne eigenes T-Zell-Repertoire, was es ihnen erleichtert, sich zu teilen und zusätzlich zu T-Zellaktivierung führen könnte (106). Zum anderen könnte die Effektorfunktion der adoptiv transferierten CD8⁺ T-Zellen in Rag1^{-/-} Mäusen durch das Fehlen von CD4 Helfer-T-Zellen beeinträchtigt sein. Weiterhin könnte die Anwesenheit beider antigenexprimierenden Tumoren die Dtg-T-Zellen beeinflusst haben. Um zu untersuchen, ob ova257- bzw. gp33-stimulierte Dtg-T-Zellen das Wachstum von B16-gp33 Melanom-Zellen in vergleichbarer Weise in C57Bl/6 Mäusen unterdrücken, wurden T-Zellen von P14 und Dtg Mäusen, wie im vorherigen Experiment, für 72 h antigenspezifisch *in vitro* mit Peptid stimuliert. 5x10⁶ gp33- bzw. ova257-stimulierte T-Zellen von Dtg oder gp33-stimulierte T-Zellen von P14 Mäusen wurden in C57Bl/6 Mäuse *iv.* injiziert, denen einen Tag zuvor 5x10⁴ B16-gp33 Tumorzellen *sc.* injiziert worden waren. In Mäusen, die keinen adoptiven T-Zelltransfer erhalten hatten, wuchsen die Tumoren zwischen Tag 11 und 18 aus (Abb. 21). Der adoptive Transfer von gp33- als auch ova257-stimulierten Dtg-T-Zellen wie auch von gp33-stimulierten P14 T-Zellen unterdrückte das Wachstum der B16-gp33 Tumoren. Nach

adoptivem T-Zelltransfer von P14 T_E blieben 3 von 5 Mäusen tumorfrei. Jeweils 1 von 4 Mäusen, denen ova257- bzw. gp33-stimulierte Dtg-T-Zellen transferiert worden waren, unterdrückten das Wachstum des B16-gp33 Tumoren vollständig. Diese Ergebnisse bestätigen, dass OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen das Wachstum von gp33-exprimierenden B16-Melanom-Tumoren *in vivo* nach Stimulation über den OT-I oder den P14 TCR inhibieren können.

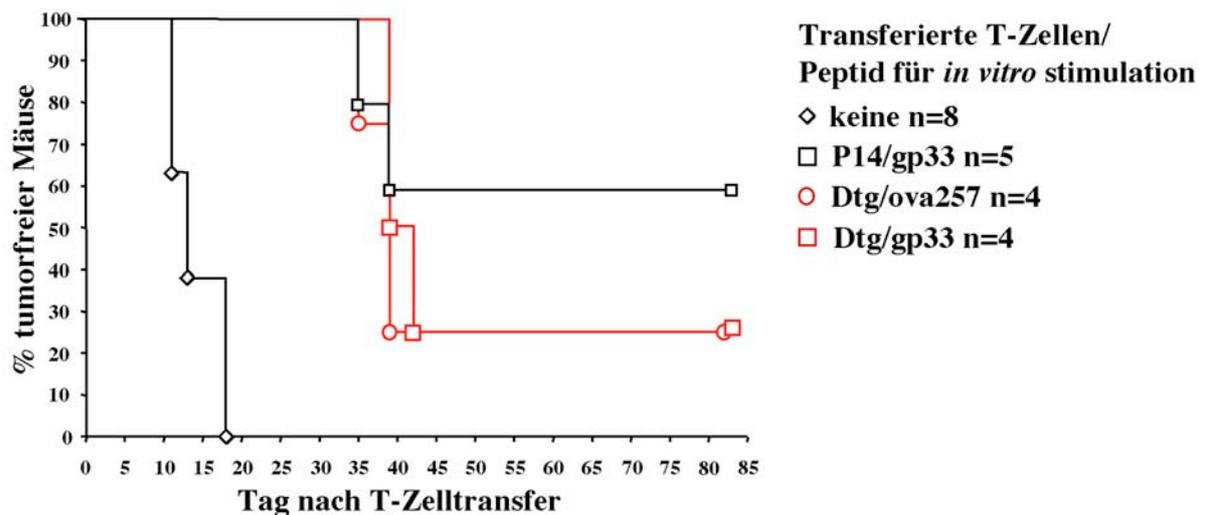


Abb. 21: Die Stimulation von Dual-TCR-T-Zellen über einen TCR ist ausreichend, um das Wachstum von B16-gp33 Tumoren in C57Bl/6 Mäusen zu inhibieren. Milzzellen von P14 und Dtg Mäusen wurden *in vitro* in Anwesenheit der angegebenen Peptide für 72 h inkubiert. 5×10^6 T_E wurden adoptiv in C57Bl/6 Mäuse transferiert, denen einen Tag zuvor *sc.* 5×10^4 B16-gp33 Melanom-Zellen injiziert worden waren. Gezeigt ist der Prozentsatz tumorfreier Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach adoptivem T-Zelltransfer. Die Menge der analysierten Mäuse ist indiziert.

5.9 OT-I/P14 Dtg-T_E induzieren schweren Diabetes in RIP-mOva Mäusen

Die Frage, ob die Unterdrückung des Tumorstwachstums durch Dual-TCR-T-Zellen, die Tumorantigen- (gp33) und autoantigen- (ova257) spezifische TCR auf der Oberfläche exprimieren, von Autoimmunität in Mäusen, die Ova als Autoantigen exprimieren, begleitet ist, sollte im folgenden Experiment geklärt werden. Als Autoimmunmodell dienten RIP-mOva Mäuse, welche die membrangebundene Form von Ovalbumin in den β -Zellen des Pankreas, den proximalen Tubuluszellen der Niere sowie in geringen Mengen im Thymus exprimieren. RIP-mOva Mäuse sind für das Ova-Antigen, welches in diesen Mäusen kreuzpräsentiert wird, tolerant (97). Die Zerstörung der β -Zellen in RIP-mOva Mäusen verursacht eine verminderte Insulinproduktion und resultiert in erhöhten Blutglukosewerten.

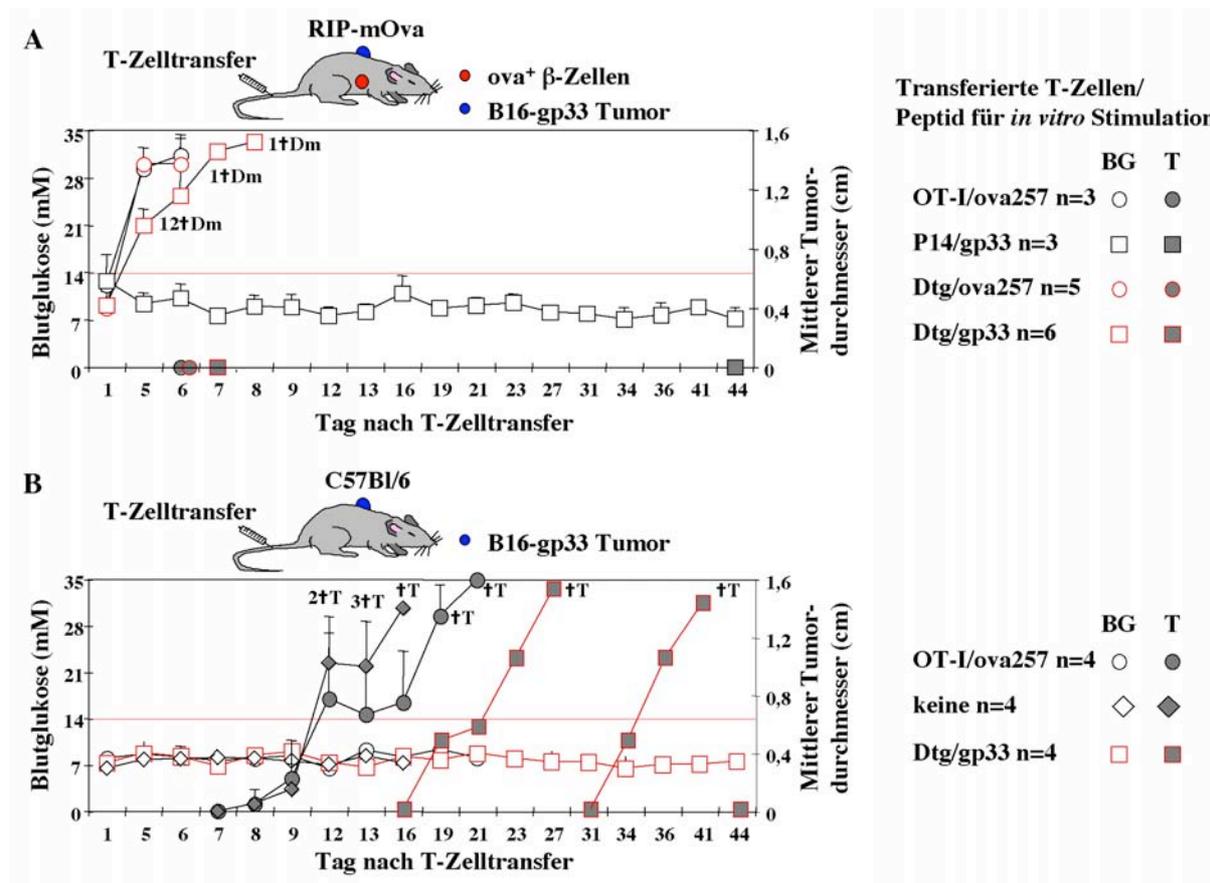


Abb. 22: OT-I/P14 Dtg-T_E induzieren schweren Diabetes in RIP-mOva Mäusen. Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden *in vitro* in Anwesenheit der angegebenen Peptide für 72 h inkubiert. 1×10^7 T_E wurden adoptiv in RIP-mOva bzw. C57Bl/6 Geschwister-Mäuse transferiert, denen einen Tag zuvor *sc.* 4×10^5 B16-gp33 (Klon 25) Melanom-Zellen injiziert worden waren. Gezeigt sind die Blutglukosekonzentration (BG, offene Symbole) sowie der mittlere Tumordurchmesser (T, gefüllte Symbole) zu verschiedenen Zeitpunkten nach adoptivem T-Zelltransfer in RIP-mOva (A) und C57Bl/6 Mäusen (B) als kombinierte Resultate aus zwei individuellen Experimenten (Dtg □ RIP-mOva), aus einem Experiment (OT-I) bzw. aus einem von zwei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Die Anzahl der analysierten Mäuse ist indiziert. Der Todeszeitpunkt der Mäuse, die aufgrund von Tumoren (†T) oder von schwerem Diabetes (†Dm) getötet werden mussten, ist indiziert.

Mäuse mit einer Blutglukosekonzentration von ≥ 14 mM gelten als diabetisch, d.h., sie sind an Diabetes mellitus erkrankt. T-Zellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden, wie in den vorangegangenen Experimenten, für 72 h in antigenspezifischer Weise mit ova257- oder gp33-Peptiden *in vitro* stimuliert. 1×10^7 ova257-stimulierte T-Zellen von OT-I bzw. Dtg Mäusen oder gp33-stimulierte T-Zellen von P14 bzw. Dtg Mäusen wurden *iv.* in RIP-mOva bzw. C57Bl/6 Geschwister-Mäuse injiziert, denen einen Tag zuvor 4×10^5 B16-gp33 (Klon 25) (siehe Kapitel 4.1.1) Tumorzellen *sc.* injiziert worden waren.

Der adoptive Transfer von OT-I als auch Dtg-T_E induzierte in RIP-mOva Mäusen schweren Diabetes (Abb. 22A). Der Blutzuckerspiegel stieg durchschnittlich von 8-13 mM auf 21 bis $\geq 33,3$ mM an. Diabetische RIP-mOva Mäuse zeigten starke Symptome einer Diabeteserkrankung, wie Schwäche und Auszehrung (*diabetic wasting*) und wurden deshalb nach zweimaliger Messung von Blutglukosewerten von ≥ 25 mM getötet. Die Blutglukosewerte blieben in RIP-mOva Mäusen nach Transfer von P14 T_E mit 7-10 mM im normalen Bereich. Das Wachstum der B16-gp33 Tumoren wurde in RIP-mOva Mäusen, denen P14 T_E transferiert worden waren, unterdrückt. Nach 44 Tagen waren 3/3 Mäusen tumorfrei.

Die Konzentration von Glukose im Blut von C57Bl/6 Mäusen blieb nach adoptivem Transfer von OT-I oder gp33-stimulierten Dtg-T_E mit durchschnittlich 7-9 mM normal und war vergleichbar mit der Blutglukosekonzentration in C57Bl/6 Mäusen, denen keine T-Zellen injiziert worden waren (Abb. 22B). In C57Bl/6 Mäusen, die ova257-stimulierte OT-I T-Zellen erhalten hatten bzw. denen keine T-Zellen transferiert worden waren, wuchsen die B16-gp33 Tumoren zwischen Tag 8 und 13 aus (Abb. 22B), während der adoptive Transfer von gp33-stimulierten Dtg-T-Zellen das Wachstum der B16-gp33 Tumoren in 2/4 C57Bl/6 Mäusen bis Tag 16 und 31 unterdrückte. 2/4 C57Bl/6 Mäuse waren 44 Tage nach Transfer von gp33-stimulierten Dtg-T-Zellen tumorfrei.

Diese Ergebnisse zeigen, dass OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen, die über Tumorantigen- (gp33) bzw. Autoantigen- (ova257) spezifische TCR aktiviert wurden, in RIP-mOva Mäusen schweren Diabetes induzieren.

5.10 Die Unterdrückung des Tumorwachstums durch OT-I/P14 Dtg-T_E induziert in RIP-Ova^{lo} Mäusen milden Diabetes

Um den Einfluss der Expressionshöhe des Autoantigens bei der Induktion von Autoimmunität durch Dtg-T_E zu untersuchen, wurden diese adoptiv in RIP-Ova^{lo} Mäuse transferiert. RIP-Ova^{lo} Mäuse exprimieren sehr geringe Mengen Ova in den β -Zellen des Pankreas, welches vom Immunsystem dieser Mäuse ignoriert wird (96). T-Zellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden für 72 h in antigenspezifischer Weise mit ova257- oder gp33-Peptiden *in vitro* stimuliert. 1×10^7 ova257-stimulierte T-Zellen von OT-I bzw. Dtg Mäusen oder gp33-stimulierte T-Zellen von P14 bzw. Dtg Mäusen wurden in RIP-Ova^{lo} bzw. C57Bl/6 Mäuse *iv.* injiziert, denen einen Tag zuvor 5×10^4 B16-gp33 Tumorzellen *sc.* injiziert worden waren.

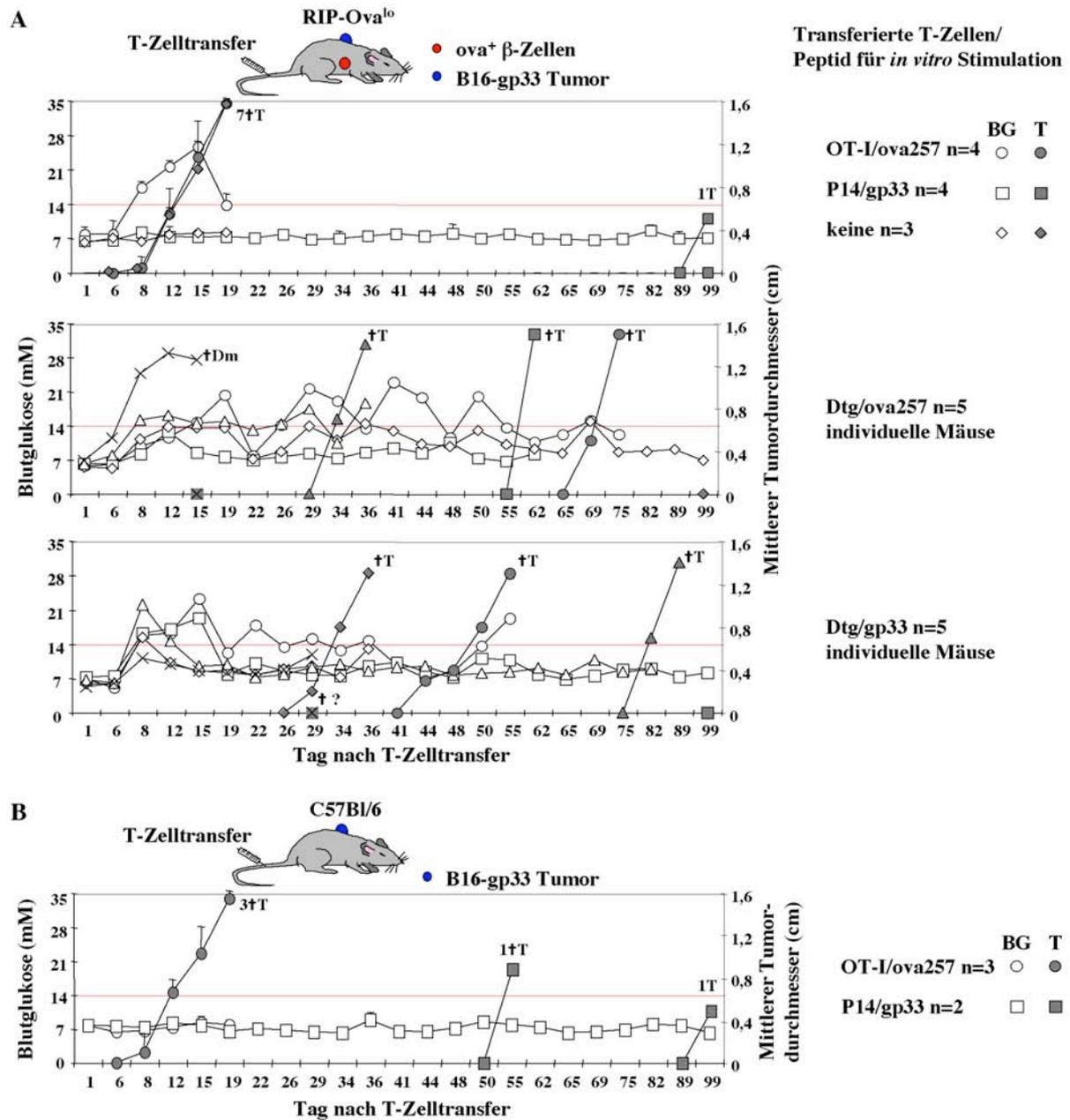


Abb. 23: Die Unterdrückung des Tumorwachstums durch OT-I/P14 Dual-TCR T_E ist in RIP-Ova^{lo} Mäusen von milder Diabetesinduktion begleitet. Milzzellen von OT-I, P14 und Dtg Mäusen wurden *in vitro* in Anwesenheit der angegebenen Peptide für 72 h inkubiert. 1×10^7 T_E wurden adoptiv in RIP-Ova^{lo} bzw. C57Bl/6 Mäuse transferiert, denen einen Tag zuvor *sc.* 5×10^4 B16-gp33 Melanom-Zellen injiziert worden waren. Gezeigt sind die Blutglukosekonzentration (BG, offene Symbole) sowie der mittlere Tumordurchmesser (T, gefüllte Symbole) zu verschiedenen Zeitpunkten nach adoptivem T-Zelltransfer in RIP-Ova^{lo} (A) und C57Bl/6 Mäusen (B) als individuelle oder kombinierte Resultate. Die Anzahl der analysierten Mäuse ist indiziert. Der Todeszeitpunkt der Mäuse, die aufgrund von Tumoren (†T) oder von schwerem Diabetes (†Dm) getötet werden mussten bzw. von Mäusen, die während des Experiments mit unbekannter Ursache verstorben sind (†?), ist indiziert. Gezeigt ist ein vorläufiges Experiment.

OT-I T_E induzierten 8 Tage nach adoptivem Transfer in RIP-Ova^{lo} Mäusen, ähnlich wie in RIP-mOva Mäusen, Diabetes (Abb. 23A). Die Blutglukosekonzentration stieg von durchschnittlich 8 mM auf 14-26 mM an. Jedoch zeigten diabetische RIP-Ova^{lo} Mäuse bei Blutglukosewerten von < 28 mM im Gegensatz zu RIP-mOva Mäusen keine äußerlichen Anzeichen von Schwäche und wurden deshalb über einen längeren Zeitraum beobachtet. RIP-Ova^{lo} Mäuse, denen P14 T_E injiziert worden waren oder die keinen adoptiven T-Zelltransfer erhalten hatten, veränderten ihre Blutglukosekonzentration von durchschnittlich 6-9 mM nicht. Ova257- als auch gp33-stimulierte Dtg-T_E induzierten 8-15 Tage nach Transfer in je 4/5 RIP-Ova^{lo} Mäusen Diabetes. Die Blutglukosekonzentration erhöhte sich von durchschnittlich 6-7 auf 14-17 mM. Einen leichten Anstieg der Blutglukosekonzentration von durchschnittlich 8 mM auf 11-13 mM wurde in je 1/5 RIP-Ova^{lo} Mäusen, denen ova257- bzw. gp33-stimulierte Dtg-T_E transferiert worden waren, gemessen. Die Diabeteserkrankung war in RIP-Ova^{lo} Mäusen in 3/4 Dtg/gp33- und in 1/4 Dtg/ova257-Rezipienten transient.

Die B16-gp33 Tumoren wuchsen in RIP-Ova^{lo} Mäusen, denen keine bzw. ova257-stimulierte OT-I T-Zellen transferiert worden waren, zwischen Tag 8 und 19 aus (Abb. 23A). Der adoptive Transfer von gp33-stimulierten P14 T-Zellen unterdrückte das Wachstum der B16-gp33 Tumoren in 4/4 RIP-Ova^{lo} Mäusen. Ova257- als auch gp33-stimulierte Dtg-T-Zellen unterdrückten das Wachstum der B16-gp33 Tumoren in 8/8 RIP-Ova^{lo} Mäusen. 99 Tage nach Transfer von P14 T-Zellen waren 3/4 und nach Transfer von Dtg-T-Zellen 2/8 Mäusen tumorfrei.

In C57Bl/6 Mäusen, die ova257-stimulierte OT-I T-Zellen erhalten hatten, wuchsen die B16-gp33 Tumoren zwischen Tag 8 und 19 aus (Abb. 23B), während der adoptive Transfer von gp33-stimulierten P14 T-Zellen das Wachstum der B16-gp33 Tumoren in 2/2 C57Bl/6 Mäusen bis Tag 50 bzw. 89 unterdrückte. Die Konzentration von Glukose im Blut von C57Bl/6 Mäusen blieb sowohl nach adoptivem Transfer von P14 als auch von OT-I T_E mit 6-9 mM normal.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Unterdrückung des Wachstums von B16-gp33 Tumoren durch OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen, die über Tumorantigen- (gp33) bzw. Autoantigen- (ova257) spezifische TCR aktiviert worden waren, in RIP-Ova^{lo} Mäusen von Diabetesinduktion begleitet ist, aber auch, dass RIP-Ova^{lo} Mäuse trotz der teilweise dauerhaft erhöhten Blutglukosewerte die Diabeteserkrankung tolerieren können.