

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
2	<i>Einleitung</i>	<i>I</i>
2.1	Adoptive zelluläre Immuntherapie.....	1
2.2	Generierung von T-Zellen bestimmter Spezifität durch TCR-Gentransfer.....	1
2.3	Der T-Zellrezeptorkomplex und die Antigenerkennung durch T-Zellen	3
2.4	Die Vielfalt der T-Zellrezeptoren	4
2.5	Die Klonalität der $\alpha\beta$ T-Zellen.....	5
2.6	Mechanismen der Toleranz	8
2.7	Ignoranz, Tumorabstoßung und Autoimmunität.....	9
2.8	Natürliche und transgene Dual-TCR-T-Zellen.....	11
2.9	Dual-TCR-T-Zellen durch TCR-Gentransfer	11
3	<i>Aufgabenstellung</i>	<i>14</i>
4	<i>Material und Methoden</i>	<i>16</i>
4.1	Material	16
4.1.1	Zelllinien.....	16
4.1.2	Mäuse.....	16
4.1.3	Peptide	17
4.1.4	Oligonukleotide (Primer)	18
4.1.5	Reagenzien.....	19
4.1.6	Versuchssysteme (Kits).....	20
4.1.7	Puffer und Lösungen.....	21
4.1.8	Antikörper.....	21
4.1.9	Rekombinante MHC-Tetramere	22
4.1.10	Verbrauchsmaterialien	22
4.1.11	Geräte.....	22
4.2	Methoden	24
4.2.1	Zellkultur	24
4.2.1.1	Inkubation	24
4.2.1.2	Bestimmen der Zellzahl	24
4.2.1.3	Adhärente Zellkulturen	24
4.2.1.4	Suspensionszellkulturen.....	24
4.2.1.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	24
4.2.2	Konstruktion retroviraler P14-TCR α - bzw. TCR β -Expressionsvektoren	25
4.2.2.1	Präparative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	25
4.2.2.2	Präparativer Restriktionsverdau.....	25
4.2.2.3	DNA-Ligation.....	26
4.2.2.4	Transformation von E.coli DH5 α -Zellen.....	27
4.2.2.5	Plasmidpräparation.....	28
4.2.2.6	DNA-Sequenzierung	28
4.2.3	In vitro Experimente	29
4.2.3.1	Nukleofektion.....	29
4.2.3.2	Generierung stabiler Retrovirus-Produzenten-Zelllinien.....	29
4.2.3.3	Herstellung von Virus-ZKÜ	29
4.2.3.4	Retronektin-Beschichtung von Zellkulturplatten.....	30
4.2.3.5	Infektion mit Virus-ZKÜ (Transduktion).....	30
4.2.3.6	Isolierung von Milzzellen aus der Maus	31

4.2.3.7	Stimulation der Milzzellen.....	31
4.2.3.8	Färbung von T-Zellen mit Antikörpern und rekombinanten MHC-Tetrameren	32
4.2.3.9	Durchflusszytometrie (DFZ).....	32
4.2.3.10	CFSE Proliferationsassay.....	32
4.2.3.11	Intrazelluläre Zytokinfärbung	33
4.2.3.12	Subklonierung von Zellen.....	34
4.2.4	In vivo Experimente in Mäusen.....	34
4.2.4.1	Untersuchung der Mausgenotypen	34
4.2.4.2	Injektion von Tumorzellen.....	34
4.2.4.3	Adoptiver T-Zelltransfer.....	35
4.2.4.4	Messung der Blutglukosekonzentration	35
4.2.5	Weitere molekularbiologische Arbeiten.....	35
4.2.5.1	RNA-Präparation.....	35
4.2.5.2	Herstellung von cDNA.....	36
4.2.5.3	Isolation von genomischer DNA	36
4.2.5.4	PCR.....	37
4.2.5.5	Restriktionsverdau von DNA.....	38
4.2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
5	Ergebnisse.....	40
5.1	OT-I/P14 Dtg-T-Zellen exprimieren beide TCR und haben doppelte Spezifität	40
5.2	OT-I/P14 Dtg-T-Zellen sind funktionell aktiv und reagieren auf beide Peptide <i>in vitro</i>	40
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	42
5.4	OT-I und P14 Stg- und OT-I/P14 Dtg-T-Zellen zeigen ähnliche Sensitivität gegenüber beiden Peptiden.....	46
5.5	OT-I und P14 TCR können hybride Heterodimere unbekannter Spezifität bilden.....	48
5.5.1	P14/OT-I \square T-Zellen exprimieren P14 \square /OT-I \square -Heterodimere unbekannter Spezifität.....	48
5.5.2	P14/OT-I \square T-Zellen haben ähnliche Sensitivität gegenüber gp33 Peptiden wie P14 Stg-T-Zellen.....	50
5.5.3	P14 \square -transduzierte OT-I T-Zellen können OT-I \square /P14 \square -Heterodimere unbekannter Spezifität exprimieren.....	50
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	53
5.7	Reisolierte T-Zellen bewahren die Fähigkeit, IFN\square als Antwort auf beide Peptide zu produzieren.....	54
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	56
5.9	OT-I/P14 Dtg-T_E induzieren schweren Diabetes in RIP-mOva Mäusen.....	57
5.10	Die Unterdrückung des Tumorwachstums durch OT-I/P14 Dtg-T_E induziert in RIP-Ova^{lo} Mäusen milden Diabetes.....	59
6	Diskussion.....	62
6.1	Verschiedene Dtg Mäuse variieren in der Expression beider TCR.....	62

6.2	Die Spezifität der OT-I und P14 TCR ist von beiden TCR-Ketten abhängig	63
6.3	OT-I und P14 TCR-Ketten können hybride Heterodimere bilden, paaren aber vorrangig mit verwandten TCR-Ketten	64
6.4	Konkurrenz um TCR-Ketten.....	65
6.5	Funktionalität beider TCR von Dual-TCR-T-Zellen <i>in vitro</i>	66
6.6	Einfluss der TCR-Expressionshöhe auf die Peptidsensitivität <i>in vitro</i>	66
6.7	Wie beeinflussen sich beide TCR von Dual-TCR-T-Zellen <i>in vitro</i> ?	67
6.8	Die OT-I und P14 TCR Expression ist nicht von IFN γ beeinflusst.....	67
6.9	Anti-Tumorantwort beider TCR von Dual-TCR-T-Zellen <i>in vivo</i>	67
6.10	Induktion von Autoimmunität durch Dual-TCR-T-Zellen.....	69
7	<i>Ausblick</i>	72
8	<i>Zusammenfassung</i>	74
9	<i>Summary</i>	75
10	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	76
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	79
12	<i>Anhang</i>	88
12.1	Publikationen und Kongressteilnahmen	88
12.1.1	Publikationen.....	88
12.1.2	Teilnahmen an Workshops und Kongressen (Vorträge* und Poster).....	88
12.2	Eidesstattliche Erklärung	89