

## 6 Diskussion

Die Anwendung TCR-reprogrammierter T-Zellen in der zellulären Immuntherapie ist ein viel versprechender Ansatz, der konventionelle Therapien viraler und onkologischer Erkrankungen ergänzen könnte. Im Rahmen klinischer Studien konnte die Effektivität des adoptiven T-Zelltransfers gezeigt werden. Jedoch wäre es erstrebenswert, Immunzellen der gewünschten Spezifität schnell und auf effektive Weise herstellen zu können. Hierbei kann der Transfer von TCR-Genen T-Zellen mit den gewünschten Eigenschaften ausstatten. Die Methode des TCR-Gentransfers befindet sich in ihrer Etablierungsphase. Zum einen wird geprüft, wie der Transfer von Genen noch effizienter erfolgen kann, zum anderen muss untersucht werden, ob der adoptive Transfer von TCR-reprogrammierten T-Zellen Nebenwirkungen nach sich zieht, welche die Gesundheit beeinträchtigen würden. Durch Reprogrammierung von T-Zellen mit exogenen TCR werden Dual-TCR-T-Zellen generiert, also T-Zellen, die einen zweiten, endogenen TCR, oft unbekannter Spezifität, besitzen. Letzteres macht es schwer, den Einfluss der Expression eines zusätzlichen TCR zu analysieren. Mäuse, die für die Gene zweier verschiedener TCR transgen sind, können Dual-TCR-T-Zellen generieren und bieten die Möglichkeit, T-Zellen mit zwei verschiedenen TCR bekannter Spezifität zu analysieren. Wir generierten OT-I/P14 Dtg Mäuse und fanden, dass diese OT-I und P14 TCR simultan auf ihren T-Zellen exprimieren. Die Anwesenheit endogener TCR war in diesem Modell ausgeschlossen, da den Mäusen das Rag1-Gen fehlte.

### 6.1 Verschiedene Dtg Mäuse variieren in der Expression beider TCR

Die Mehrheit der OT-I/P14 Dtg-T-Zellen exprimierte beide TCR. Im Vergleich dazu exprimierten T-Zellen anderer Dtg Mäuse nicht simultan beide TCR auf der Oberfläche einer T-Zelle, obwohl die mRNA der vier TCR-Ketten translatiert wurde (71). In diesen Mäusen schien die Expression der  $\alpha\beta$ -Heterodimere posttranslational reguliert zu werden. Korrelierend mit unseren Ergebnissen wurden andere Dtg Mausmodelle beschrieben, in denen beide TCR gemeinsam auf der T-Zelloberfläche anwesend waren (71, 74, 77, 81). Bisher nicht bestimmte Faktoren scheinen daher einen Einfluss darauf zu haben, ob beide TCR simultan exprimiert werden. Der Erfolg eines TCR, auf der Oberfläche der T-Zelle zu erscheinen, ist vom Zeitpunkt der TCR-Expression während der Entwicklung im Thymus abhängig. Legrand *et al.* zeigte in weiblichen Dtg Mäusen, die P14 und HY TCR- (spezifisch für das männliche HY-Antigen) Transgene enthielten, dass die P14 $\beta$ -Transgene relativ spät

während der Reifung der T-Zellen im Thymus exprimiert werden. Dies beeinträchtigte wahrscheinlich die Möglichkeit der P14 TCR $\alpha$ -Expression, die nur auf sehr wenigen T-Zellen der P14/HY Mäuse nachweisbar war (107). Weiterhin wurde gezeigt, dass P14 T-Zellen  $\alpha$  TCR koexprimieren können, was wiederum mit der späten P14 TCR-Expression während der Thymusentwicklung erklärt werden könnte (108). Das Phänomen, dass nur die Expressionshöhe des einen TCR in Dual- im Vergleich zu Einzel-TCR-T-Zellen der gleichen Spezifität reduziert ist, wie es für den P14 TCR in OT-I/P14 Dtg-T-Zellen gezeigt ist, wurde in weiteren Dual-TCR-Modellen beschrieben (72, 76, 77). Andere Autoren hingegen demonstrierten eine reduzierte Expression beider TCR (74, 109). Letzteres könnte durch die Promotor/*Enhancer*-Regionen, welche die Expression der TCR-Kettengene in TCR-transgenen Mäusen kontrollieren, beeinflusst sein. In den Konstrukten der OT-I/P14 Dtg Mäuse sind die OT-I $\alpha$ -, P14 $\alpha$ - und P14 $\beta$ -Kettengene durch den MHC-Klasse-I-Promotor und Immunglobulinschwerketten-*Enhancer* reguliert, während das OT-I $\beta$ -Kettengen durch den TCR-Promotor/*Enhancer* kontrolliert wird. Letzteres könnte erklären, weshalb in OT-I/P14 Dtg Mäusen ausschließlich die Expressionshöhe des P14 TCR, nicht aber die des OT-I TCR im Vergleich zu einzeltransgenen T-Zellen reduziert ist. Weitere Faktoren, wie der Wettbewerb um die Komponenten des CD3 Komplexes oder Gendosiseffekte, könnten die relative TCR-Expression diktieren. Die Tendenz der TCR-Ketten, hybride Dimere zu bilden, deren neue Spezifitäten die negative Selektion der T-Zellen zur Folge haben könnten, würden die Expressionshöhe beider TCR auf einer T-Zelle ebenso beeinflussen.

## 6.2 Die Spezifität der OT-I und P14 TCR ist von beiden TCR-Ketten abhängig

In OT-I-TCR $\alpha$ -transgenen Mäusen, die beide Rag-Gene besitzen, bilden OT-I $\alpha$ -Ketten mit verschiedenen endogenen  $\beta$ -Ketten TCR, die für Ova-Peptide spezifisch sind (110). Des Weiteren wurde in Mäusen, die ausschließlich für die P14 $\alpha$ - bzw. P14 $\beta$ -TCR-Ketten transgen waren, gezeigt, dass die P14 $\alpha$ - bzw. P14 $\beta$ -Ketten mit verschiedenen endogenen TCR $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten paaren (111). LCMV reaktive CTL, die vorwiegend gegen das originale P14 T-Zell-Epitop gp32-42 gerichtet waren, exprimierten in P14 $\alpha$ -transgenen Mäusen überwiegend V $\alpha$ 2, während CTL von P14 $\beta$ -transgenen Mäusen vorwiegend V $\alpha$ 8.1<sup>+</sup> (aber auch V $\alpha$ 8.3<sup>+</sup>) waren, indizierend, dass die P14-TCR-Ketten präferentiell mit verwandten TCR-Ketten paaren. Allerdings war nicht auszuschließen, dass eine TCR-Kette für die Antigenerkennung

wichtiger ist bzw. unabhängig von der zweiten Kette agieren könnte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass in P14/OT-I $\alpha$ -transgenen T-Zellen bzw. in P14 $\alpha$ -transduzierten OT-I T-Zellen hybride P14 $\alpha$ /OT-I $\alpha$ - bzw. OT-I $\alpha$ /P14 $\alpha$ -Heterodimere exprimiert werden. Jedoch waren T-Zellen aus P14/OT-I $\alpha$ -transgenen Mäusen ausschließlich für gp33-Peptide und P14 $\alpha$ -transduzierte OT-I T-Zellen ausschließlich für ova257-Peptide spezifisch. Letzteres zeigt, dass die OT-I $\alpha$ - bzw. P14 $\alpha$ -Ketten allein nicht ausreichen, um die Spezifität der OT-I bzw. P14 TCR zu vermitteln, welche demnach von der zusätzlichen Anwesenheit der verwandten  $\beta$ -Ketten dieser Rezeptoren abhängt. Ergebnisse früherer Studien ließen vermuten, dass die P14 $\alpha$ -Kette für die gp33/H-2D<sup>b</sup>-Erkennung wichtiger ist als die P14 $\beta$ -Kette (112, 113). Unsere Ergebnisse zeigen, dass nur P14 $\alpha\beta$ -kotransduzierte, nicht aber P14 $\alpha$ -transduzierte OT-I T-Zellen gp33-Spezifität haben, indizierend, dass die P14 $\alpha$ -Kette für die Spezifität des TCR nicht ausreichend ist. Dass die P14 $\alpha$ -Kette zusammen mit der OT-I $\alpha$ -Kette exprimiert werden kann, haben wir indirekt in P14/OT-I $\alpha$ -transgenen T-Zellen gezeigt, in denen P14 $\alpha$ /OT-I $\alpha$ -Heterodimere exprimiert wurden. Weiterhin konnte die V $\beta$ 2-Expression in der P14 $\alpha$ -transduzierten T-Zelllymphomlinie B3Z (V $\beta$ 13<sup>+</sup>, V $\beta$ 5<sup>+</sup>) nachgewiesen werden (bisher unveröffentlichte Ergebnisse von D. Sommermeyer). Demnach ist die gp33-Spezifität der P14/OT-I $\alpha$ -transgenen T-Zellen ausschließlich auf die P14 $\alpha\beta$ -TCR-Expression zurückzuführen, während die Spezifität der simultan exprimierten P14 $\alpha$ /OT-I $\alpha$ -TCR unbekannt ist. Unsere Experimente konnten bisher nicht die Frage beantworten, ob die nach P14 $\alpha$ -Transduktion von OT-I T-Zellen exprimierten OT-I $\alpha$ /P14 $\alpha$ -Heterodimere spezifisch für ova257 sein können, was jedoch sehr unwahrscheinlich ist, oder ob die ova257-Spezifität dieser T-Zellen ausschließlich auf simultan exprimierte OT-I $\alpha$ / $\beta$ -TCR zurückzuführen ist. Dtg als auch P14/OT-I $\alpha$  T-Zellen exprimierten CD8-, aber keine CD4-Korezeptoren, indizierend, dass keine MHC-Klasse-II-restringierten T-Zellen entstanden waren.

### **6.3 OT-I und P14 TCR-Ketten können hybride Heterodimere bilden, paaren aber vorrangig mit verwandten TCR-Ketten**

Da OT-I und P14 TCR die V $\beta$ 2-Kette exprimieren und AK, die gegen die verschiedenen J $\beta$  Regionen gerichtet sind, nicht zur Verfügung standen, konnte nicht direkt analysiert werden, ob und in welchem Ausmaß OT-I $\alpha$ - und P14 $\alpha$ -Ketten mit den verwandten OT-I $\alpha$ - bzw. P14 $\alpha$ -Ketten in Dtg-T-Zellen paarten. Wie wir jedoch zeigen konnten, ist die Bildung von

---

P14 $\alpha$ /OT-I $\alpha$  und wahrscheinlich auch die von OT-I $\alpha$ /P14 $\alpha$  Hybrid-TCR mit dem Verlust von beiden ursprünglichen Antigenespezifitäten verbunden. Wie die Färbung mit den Tetrameren zeigte, waren alle T-Zellen aus OT-I/P14 Dtg Mäusen für ova257 und gp33 bzw. für ova257 Peptide allein spezifisch und hatten ähnliche Peptidsensitivität wie Stg-T-Zellen der gleichen Spezifität. Letzteres zeigt, dass auf OT-I/P14 Dtg-T-Zellen die Paarung der verwandten TCR-Ketten favorisiert wird. Letztlich kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen zusätzlich hybride TCR-Heterodimere unbekannter Spezifität auf ihrer Oberfläche haben, die aber mit den hier verwendeten Methoden (Tetramerfärbung und Analyse der Peptidsensitivität) nicht nachweisbar waren.

#### 6.4 Konkurrenz um TCR-Ketten

Die Expression der CD3 Moleküle ist auf Dtg und P14/OT-I $\alpha$  Lymphozyten im Vergleich zu Stg Lymphozyten leicht erhöht, indizierend, dass die zusätzliche Expression einer  $\alpha$ -Kette zur Expression von mehr TCR führt. Weiterhin war die V $\alpha$ 2-Dichte auf Dtg und P14/OT-I $\alpha$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen höher als auf Stg-T-Zellen. Demnach scheint der erhöhte Bedarf an  $\alpha$ -Ketten bei zusätzlicher Expression einer  $\alpha$ -Kette durch Erhöhung der  $\alpha$ -Kettenexpression ausgeglichen zu werden. Die Dichte der V $\alpha$ 5-Ketten war auf Dtg und P14/OT-I $\alpha$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbar, während P14/OT-I $\alpha$  T-Zellen mehr V $\alpha$ 8-Ketten exprimierten als Dtg-T-Zellen. Demnach konkurrieren OT-I $\alpha$ -Ketten erfolgreich mit P14 $\alpha$ -Ketten um die Expression in Dtg-T-Zellen. In Abwesenheit der OT-I $\alpha$ -Ketten stehen folglich mehr P14 $\alpha$ -Ketten zur Verfügung, um P14 $\alpha$ -Ketten zu exprimieren. Wir haben noch keine Erklärung dafür, dass die V $\alpha$ 2-Dichte auf P14/OT-I $\alpha$  und Dtg CD3<sup>+</sup> T-Zellen ähnlich zu sein scheint. Wir denken, dass die alleinige Expression der P14 $\alpha$ -Kette unwahrscheinlich ist, da die TCR-Expression in der  $\alpha$ -defizienten T-Zelllinie 58 $\alpha$  nur nach Kotransduktion mit P14 $\alpha$ - und P14 $\alpha$ -Ketten und nicht nach Transduktion mit entweder der P14 $\alpha$ - oder der P14 $\alpha$ -Kette auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte (bisher unveröffentlichte Ergebnisse von D. Sommermeyer). Weiterhin korreliert die Intensität der V $\alpha$ 8-Färbung auf P14/OT-I $\alpha$ -transgenen T-Zellen mit der der P14-Tetramerbindung, indizierend, dass P14 $\alpha$ -Heterodimere paarten. Die quantitative Analyse der TCR-Moleküle auf Dtg bzw. P14/OT-I $\alpha$  T-Zellen würde klären, ob die V $\alpha$ 2-Expressionshöhen tatsächlich ähnlich sind.

### 6.5 Funktionalität beider TCR von Dual-TCR-T-Zellen *in vitro*

OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen wurden *in vitro* durch beide Peptide zu Proliferation und IFN $\gamma$ -Produktion aktiviert. Die IFN $\gamma$ -Produktion wurde untersucht, da IFN $\gamma$  ein wichtiges Zytokin bei der Vermittlung von Tumormunität ist (114-117). OT-I und P14 Stg-T-Zellen reagierten ausschließlich in antigenspezifischer Weise, was zeigte, dass Kreuzreaktivitäten in diesem experimentellen System ausgeschlossen werden konnten. Die Antwort Dtg-T-Zellen nach gp33-Stimulation war weniger effizient als nach Stimulation mit ova257 Peptiden, was möglicherweise auf die Anwesenheit von Einzel-TCR OT-I T-Zellen innerhalb der Dtg-T-Zell-Population zurückzuführen war. Dtg-T-Zellen zeigten weder bei Proliferation noch bei IFN $\gamma$ -Produktion additive Effekte nach Stimulation mit der Kombination aus ova257 und gp33 Peptiden. Vergleichbare Resultate wurden in einem weiteren Modell erhalten, in dem CD4<sup>+</sup> Dual-TCR-T-Zellen untersucht wurden (109).

### 6.6 Einfluss der TCR-Expressionshöhe auf die Peptidsensitivität *in vitro*

Peptid-Titrationsexperimente zeigten, dass sich sowohl die Sensitivität der Dtg-T-Zellen für ova257 und gp33 als auch die der P14/OT-I $\gamma$  T-Zellen für gp33 Peptide nicht signifikant von der Stg-T-Zellen der gleichen Spezifität unterschied, obwohl die Expressionshöhe der P14 TCR in OT-I/P14 Dtg bzw. P14/OT-I $\gamma$  T-Zellen reduziert war. Des Weiteren war die Sensitivität der Dtg-T-Zellen nach Stimulation über beide TCR durch Inkubation mit dem Gemisch aus ova257 und gp33 der Sensitivität nach Stimulation mit nur einem der beiden Peptide ähnlich. Viola *et al.* zeigten, dass für die Aktivierung von T-Zellen ca. 8000 getriggerte TCR in Abwesenheit bzw. ca. 1000 getriggerte TCR in Anwesenheit von CD28-vermittelter Kostimulation notwendig sind (82). Diese Studien zeigten weiterhin, dass die T-Zell-Antwort direkt mit der TCR-Expressionshöhe korreliert und bei ca. 15.000 bis 20.000 getriggerten TCR ein Plateau erreicht. Weiterhin wurde in einer Studie von Labrecque *et al.* der Einfluss verminderter TCR-Expressionshöhe auf die *in vivo* T-Zellfunktion untersucht. Trotz ca. 5-facher Reduktion der Anzahl der TCR-Moleküle war der Einfluss auf die Antigenmenge, die für vergleichbare Aktivierung notwendig war, relativ gering (118). Zytokinantworten waren in dieser Studie mehr von der Antigenmenge als von der TCR-Expressionshöhe abhängig. Daraus schließen wir, dass, trotz der geringeren Dichte, ausreichend P14 TCR auf Dtg bzw. P14/OT-I $\gamma$  T-Zellen getriggert wurden, um eine den Stg-T-Zellen vergleichbare Aktivierung zu induzieren.

### **6.7 Wie beeinflussen sich beide TCR von Dual-TCR-T-Zellen *in vitro*?**

Es wurde gezeigt, dass die TCR-Herabmodulation in Dual-TCR-T-Zellen selektiv für den TCR ist, der Peptid gebunden hat (103, 119). Unsere Resultate in OT-I/P14 Dual-TCR-T-Zellen sind vergleichbar und zeigen überwiegend die Herabmodulation des Ligandenbindenden TCR. Die Expressionshöhe des korrespondierenden nicht beanspruchten TCR war nicht oder nur leicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu waren in Studien, in denen entweder Enterotoxin-Superantigen für die Stimulation der T-Zellen genutzt wurde (120) oder in denen die Komodulation von CD3 $\zeta$ /CD25 Chimären und TCR-Komplexen analysiert wurde (104), stimulierte und unstimulierte TCR/CD3-Komplexe in TCR-Herabmodulation und T-Zell-Signaltransduktion involviert. Diese unterschiedlichen Resultate könnten aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Systeme entstanden sein.

### **6.8 Die OT-I und P14 TCR Expression ist nicht von IFN $\gamma$ beeinflusst**

Innerhalb der TCR-Konstrukte sind die P14 $\alpha$ -, P14 $\beta$ - und die OT-I $\alpha$ -Kettengene durch MHC-Klasse-I-Promotoren reguliert. Deshalb könnte das von der T-Zelle nach Aktivierung produzierte IFN $\gamma$  nicht nur die MHC-Klasse-I-Expression, sondern zusätzlich die TCR-Expression beeinflussen haben. Die MHC-Klasse-I-Hochregulation nach Inkubation von Stg OT-I und P14 T-Zellen mit den spezifischen Peptiden war von TCR-Herabmodulation der getriggerten TCR begleitet. Weiterhin war die Expression der nicht getriggerten OT-I TCR auf Dual-TCR-T-Zellen nach gp33-Stimulation nicht signifikant beeinflusst. Vice versa zeigten P14 TCR auf Dual-TCR-T-Zellen keinen Anstieg in der Expressionshöhe nach ova257-Peptidstimulation. Folglich scheint die TCR-Herabmodulation in OT-I, P14 oder Dtg-T-Zellen nicht durch IFN $\gamma$  beeinflusst worden zu sein.

### **6.9 Anti-Tumorantwort beider TCR von Dual-TCR-T-Zellen *in vivo***

Da die Stimulation von Dual-TCR-T-Zellen über einen TCR nicht signifikant die Expression des zweiten, unbeanspruchten TCR beeinflusste, stellte sich die Frage, ob die Stimulation über einen TCR ausreichend sein würde, um Effektorfunktionen über beide TCR auszuüben. Eine vor Kurzem erschienene Studie demonstrierte, dass die Stimulation von OT-I/P14 Dtg-T-Zellen mit antagonistischen Peptiden *in vitro* zu kreuzregulatorischen Effekten in Bezug auf Proliferation, aber nicht auf Zytotoxizität führte (81). Unsere Ergebnisse zeigen, dass OT-I/P14 Dtg-T<sub>E</sub>, die über einen der beiden TCR stimuliert worden waren, das Wachstum von

---

Ova- und gp33-exprimierenden B16 Melanom-Zellen inhibieren können, indizierend, dass beide TCR-Spezifitäten *in vivo* genutzt werden. Die Aktivierung von Dtg-T-Zellen über einen TCR war demnach ausreichend, um die Effektorfunktionen beider TCR zu vermitteln. Es wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T<sub>E</sub> Antigen direkt auf B16 Melanom-Zellen erkennen und dass diese Erkennung ausreicht, um eine Antwort gegen den Tumor zu vermitteln (89). Letzteres lässt vermuten, dass in unserem Modell Dtg-T<sub>E</sub> Antigen über den ungetriggerten TCR erkannt haben. Die Immunantwort gegen B16-Tumoren benötigt IFN $\gamma$  ist aber von Perforin-vermittelter Lyse der Tumorzellen unabhängig (87, 89, 121). Deshalb hätte die IFN $\gamma$ -Produktion der transferierten T<sub>E</sub> ausreichend sein können, um systemisch das Tumorstroma zu unterdrücken. Dies ist unwahrscheinlich, da der Transfer von IFN $\gamma$ -produzierenden OT-I und P14 Stg-T<sub>E</sub> das Wachstum der B16-Tumoren nicht in antigen-unspezifischer Weise unterdrückte. Unsere Daten sind kompatibel mit früheren Resultaten, die zeigen, dass lokal produziertes IFN $\gamma$  durch Inhibition der Angiogenese auf das Tumorstroma wirkt (114, 122).

Dtg-T-Zellen schienen B16-gp33 Tumoren weniger effizient zu kontrollieren, als B16-ova Tumoren, was möglicherweise eine höhere Tendenz der B16-gp33 Tumoren, Antigenverlust-Varianten zu generieren, indiziert. Jedoch war die CTL Effektorfunktion trotz der Persistenz funktioneller spezifischer T-Zellen in Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen und der Antigenexpression auf 3/7 reisolierten B16-gp33 Tumoren nicht ausreichend, um die Tumoren komplett abzustößen. Wie früher gezeigt wurde, ist selbst systemische gp33 T-Zell-Immunität, die Mäuse vor LCMV-Infektionen schützt, nicht ausreichend, um das Wachstum von MCA102-gp33 Tumoren in C57Bl/6 Mäusen zu verhindern, da die Effektorfunktion der Lymphozyten in Tumoren nicht gewährleistet war, während T-Zellen aus Milzen dieser Mäuse funktionell waren (79). Wir können deshalb nicht ausschließen, dass die T-Zellen ihre Funktionalität innerhalb des Tumors verloren hatten. Die Antwort von Dtg CTL gegen B16-gp33 Zellen könnte durch die zusätzliche Anwesenheit der B16-ova Zellen in Rag1<sup>-/-</sup> bzw. der Ova-Expression in RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäusen beeinflusst worden sein. Dies könnte zum einen zu zusätzlicher Aktivierung der Dtg-T-Zellen führen und andererseits die Aufteilung der Zellen forcieren. Jedoch war die Unterdrückung des Wachstums von B16-gp33 Tumoren durch Dtg-T-Zellen in RIP-Ova<sup>lo</sup> und C57Bl/6 Mäusen, in denen zusammengenommen 25% bzw. 25-50% tumorfrei blieben, vergleichbar. Dennoch bleibt zu untersuchen, wie die Verteilung von

Dtg-T-Zellen *in vivo* durch Anwesenheit von beiden Antigenen beeinflusst ist und welche Rolle dabei die Antigenmenge spielt.

In C57Bl/6 und RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäuse transferierte ova257- oder gp33-stimulierte Dtg-T-Zellen unterdrückten das Wachstum von B16-gp33 Tumoren ähnlich effizient, unabhängig davon, über welchen TCR sie stimuliert wurden. Im Vergleich zu Mäusen, in die P14 T<sub>E</sub> transferiert worden waren (43-100% tumorfrei), blieben nach Transfer von Dtg-T<sub>E</sub> weniger Mäuse tumorfrei (25-50%). Deshalb können wir nicht ausschließen, dass die geringere Expressionshöhe des P14 TCR auf Dtg-T-Zellen deren Effektivität *in vivo* beeinflusst.

Die Unterdrückung der B16-gp33 Tumoren war in immunkompetenten Mäusen effizienter als in immundefizienten Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen, was einerseits auf die größere Anzahl der adoptiv transferierten T<sub>E</sub> und andererseits auf die Anwesenheit von CD4 T<sub>H</sub> bzw. IL-2 in immunkompetenten Rezipienten zurückzuführen sein könnte (60, 123, 124).

### 6.10 Induktion von Autoimmunität durch Dual-TCR-T-Zellen

Im RIP-Ova Modell wurde zuvor gezeigt, dass Ova in Abhängigkeit von seiner Expressionshöhe in drainierenden Lymphknoten präsentiert wird. Die Menge des in RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäusen präsentierten Ova ist nicht ausreichend, um naive OT-I T-Zellen zu aktivieren (98). Es kann jedoch von Ova-spezifischen CTL erkannt werden. Werden hingegen naive OT-I T-Zellen in RIP-mOva Mäuse, in denen die Expressionshöhe von Ova hoch ist, transferiert, werden sie in den drainierenden Lymphknoten des Pankreas und der Niere von kreuzpräsentiertem Ova aktiviert (125). Unsere Experimente zeigen, dass die Schwere der durch Transfer von OT-I Stg und OT-I/P14 Dtg-T<sub>E</sub> induzierten Diabeteserkrankung überwiegend von der Expressionshöhe des Autoantigens Ova abhängt. Stg- und Dtg-T<sub>E</sub> lösten eine schwere Diabeteserkrankung in RIP-mOva Mäusen aus. Wie zuvor gezeigt wurde, infiltrieren in hohen Dosen (10<sup>7</sup>) injizierte *in vitro* aktivierte OT-I T-Zellen in RIP-mOva Mäusen aufgrund der Ova-Expression in den proximalen Tubuluszellen zusätzlich die Niere (126). Deshalb müssen wir davon ausgehen, dass diabetische RIP-mOva Mäuse auch an Nephritis litten. Anders als in RIP-mOva Mäusen war die Diabeteserkrankung der RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäuse in den meisten der untersuchten Rezipienten von OT-I und Dtg-T<sub>E</sub> mild oder transient. Dabei spielte es eine untergeordnete Rolle, ob Dtg-T-Zellen mit ova257 oder gp33 Peptiden stimuliert worden waren. Allerdings war der durchschnittliche Anstieg der Blutglukosespiegel nach Transfer von ova257-stimulierten Dtg T<sub>E</sub> stärker als nach Transfer von gp33-stimulierten



Dtg T<sub>E</sub>. Des Weiteren schienen sich RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäuse nach Transfer von gp33-stimulierten Dtg-T-Zellen besser zu regenerieren als nach Transfer von ova257-stimulierten Dtg-T-Zellen. Außerdem wurde in 1/5 RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäusen durch ova257-stimulierte Dtg-T-Zellen schwerer Diabetes induziert. Die Normalisierung des Blutglukosespiegels in diabetischen Mäusen ist vermutlich auf die Regeneration der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zurückzuführen (127, 128). Letzteres könnte möglicherweise auch die Schwankungen der Blutglukosespiegel in diabetischen Mäusen erklären, die einen Wechsel zwischen CTL-vermittelter Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und deren Regeneration darstellen könnten. Die vereinzelt beobachtete Reduktion der Blutglukosekonzentration in diabetischen, tumortragenden Mäusen resultierte möglicherweise aus dem Verzicht auf Nahrungsaufnahme. Die Persistenz der Diabeteserkrankung bzw. die andauernde Unterdrückung des Wachstums der B16-gp33 Tumoren in Rezipienten von Dtg-T<sub>E</sub> indiziert, dass diese ihre Funktionalität in RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäusen erhalten.

In RIP-Ova<sup>lo</sup> und RIP-mOva Mäusen wurde die Autoimmunität gegen das zuvor ignorierte bzw. tolerierte fremde Antigen Ova untersucht. Es ist unklar, in welchem Ausmaß die in diesem Modell erhaltenen Ergebnisse die Immunantwort gegen ein natürliches Selbstantigen reflektieren. Beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antigene, Ova und gp33, werden für Studien genutzt, da sie eine ungewöhnlich hohe T-Zellantwort induzieren, die aber möglicherweise nicht die T-Zellantwort gegen TAA bzw. Selbstantigene reflektiert. Des Weiteren war die Anzahl der adoptiv transferierten autoreaktiven OT-I/P14 Dtg-T-Zellen sehr hoch. Da die Vorläuferfrequenz potentiell autoreaktiver T-Zellen in TCR-reprogrammierten polyklonalen T-Zellpopulationen geringer wäre, bleibt zu untersuchen, ob P14-TCR-reprogrammierte polyklonale T-Zellen aus RIP-mOva bzw. RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäusen Diabetes in diesen Mäusen induzieren. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen auf die mögliche Autoimmungefahr nach Transfer von Dual-TCR-T-Zellen hin, müssen aber aus den genannten Gründen vorsichtig interpretiert werden. Des Weiteren ist gezeigt, dass die Höhe der Antigenexpression darüber entscheiden kann, ob die induzierte Autoimmunität toleriert werden kann. Die hohe Expression von peripheren Selbstantigenen induziert in T-Zellen normalerweise periphere Toleranz. TCR-reprogrammierte tolerante T-Zellen könnten schwere Autoimmunität auslösen, wenn sie periphere Toleranzmechanismen umgehen können. Viele Selbstantigene werden vom Immunsystem ignoriert, da sie aufgrund ihrer geringen Expressionshöhe nicht effektiv in sekundären lymphoiden Organen präsentiert werden. Die

durch reaktivierte ignorante T-Zellen ausgelöste Autoimmunität könnte demnach tolerierbar sein. Letzteres setzt wahrscheinlich voraus, dass sich zerstörte Zellen, wie die  $\beta$ -Zellen, regenerieren können.