

### 3. DISKUSSION

Noch vor einigen Jahren war ungeklärt, ob eine spontane T-Zell-Antwort gegen Tumorantigene im peripheren Blut von Tumorpatienten vor einer Immuntherapie existiert. Unsere erste Studie (2.1) zur Analyse der T-Zell-Antwort gegen die TAA CEA, EpCAM und her-2/neu zeigte eine spontane, TAA-gerichtete T-Zell-Antwort im peripheren Blut von ca. 30% der getesteten CRC-Patienten. Diese Erkenntnis wurde nahezu zeitgleich auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Arlen et al., (108) fanden T-Zell-Antworten gegen ein modifiziertes CEA-Peptid bei etwa einem Drittel der Patienten mit CEA-exprimierenden Tumoren (zumeist CRC) – ebenfalls mittels IFN $\gamma$  ELISPOT Assay. Zier et al. (109) gelang der direkte Nachweis von spezifischen T-Zellen gegen von autologen Tumorzellen extrahierte Peptidepitope bei CRC-Patienten mit Lebermetastasen. Bremers et al. (110) konnten bei drei von vier CRC-Patienten spezifische CD4(+) T-Zellen, die gegen MHC-Klasse II-restringierte Peptide aus autologem Tumorlysate gerichtet waren, nachweisen. Darüber hinaus wurden in unserer Arbeit noch zwei weitere Punkte gezeigt, nämlich, dass her-2/neu überhaupt ein TAA beim CRC ist, wie es zuvor nur beim Ovarialkarzinom und beim Mammakarzinom beschrieben worden war (111, 112), und dass das verwendete Ep-CAM Peptid 263–271, das zuvor in HLA-A2 transgenen Mäusen charakterisiert worden war (113), tatsächlich von T-Zellen der CRC-Patienten erkannt wird und damit ein humanes T Zell-Epitop darstellt. Wir können nicht sicher sagen, ob die von uns detektierten T-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen tatsächlich zu zerstören, aber wir nehmen an, dass sie funktionell aktiv sind, da sie 1.) IFN $\gamma$  produzieren und 2.) einen Phänotyp aufweisen, der den Effektor T-Zellen zugeordnet werden kann, für die bekannt ist, dass sie Perforin und Granzym sezernieren können (106). In unserer Studie traten die T-Zell-Antworten gegen TAA zunächst nur bei Patienten mit metastasiertem CRC auf, was sich durchaus mit Studien zu Anti-TAA-Antikörpern bei Patienten mit malignen Erkrankungen deckt (29). Eine mögliche Erklärung für ein erhöhtes Auftreten der spezifischen T-Zellen nach Metastasierung ist zum Beispiel, dass eine Interaktion im Lymphknoten eine Voraussetzung für die Entwicklung einer Immunantwort ist. Alternativ könnte man auch spekulieren, dass die TAA-spezifischen T-Zellen im limitierten Stadium im Tumor gehalten werden, während sie im Verlauf des Progresses in die Peripherie wandern, weil sie den „Halt“ im Tumor durch Ag-Verlust, HLA-Herunterregulation oder andere „Immune Escape“ Mechanismen verloren haben. In einer Folgestudie (2.2) konnten wir in einer etwas vergrößerten Patientenzahl die Befunde aus der o.g. Arbeit bestätigen. Hier fanden wir im peripheren Blut von 12 der 49 getesteten CRC Patienten spezifische T-Zellen

gegen mindestens eines der HLA\*0201 bindenden Epitope der TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA. Erstmals fand sich in dieser Studie eine TAA-gerichtete T-Zell-Antwort auch bei 2 von 21 Patienten (9,5%) im limitierten Stadium des CRC (UICC I und II). Die Häufigkeit der T-Zell-Antwort im metastasierten Stadium (UICC III und IV; 35,7%) war jedoch weiterhin signifikant größer als im limitierten Stadium. In erstaunlichem Gegensatz zu den Ergebnissen beim CRC, fanden wir bei keiner der 20 untersuchten Mammakarzinompatientinnen eine funktionelle ex vivo T-Zell-Antwort gegen die gleichen TAA. Wir haben zwar die individuelle Ag-Expression im Tumorgewebe der einzelnen Patienten nicht untersucht, aber in der Literatur gibt es ausreichend Belege, dass die genannten TAA in beiden Tumorentitäten ähnlich stark expremiert sind. Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass die beiden Patientengruppen vergleichbar sind. Der Unterschied in der TAA-gerichteten T-Zell-Antwort zwischen CRC-Patienten und Mammakarzinompatientinnen war signifikant, wohingegen die T-Zell-Antworten gegen Influenza und ein Mitogen bei beiden Gruppen gleich waren. Unsere Befunde stehen im Einklang mit Studien von Feuerer et al. (114, 115), die aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen keine gegen autologes Tumorlysat gerichteten T-Zellen expandieren konnten. Im Gegensatz zu ihren funktionellen ELISPOT Daten, fand diese Arbeitsgruppe (114, 115) mittels Tetrameren bis zu 1% her-2/neu- oder MUC1-spezifische CD8(+) T-Zellen bei jeweils einem Drittel ihrer Patienten. Bemerkenswerterweise, konnte dieselbe Arbeitsgruppe her-2/neu- und MUC1-reaktive, funktionell aktive T-Zellen aus dem Knochenmark von zwei Dritteln der untersuchten Mammakarzinompatientinnen mittels IFN $\gamma$  ELISPOT Assay nachweisen (114, 115). Diese Daten legen ein bevorzugtes Homing der funktionell aktiven, her-2/neu- and MUC1-spezifischen T-Zellen in das Knochenmark der Mammakarzinompatientinnen nahe. Diese Beobachtung ist insofern wichtig, als dass Mammakarzinomzellen als „minimale Resterkrankung“ im Knochenmark überdauern können (116). Disis et al. (117) fanden ebenfalls keine CD8(+) T-Zell-Antworten gegen ein weiteres HLA-A2-bindendes her-2/neu-Epitop (369-377) im Blut von 8 Mammakarzinompatientinnen. Hingegen detektierte diese Arbeitsgruppe (117) CD4(+) T-Zell-Antworten gegen das her-2/neu Protein bei 5 von 45 Mammakarzinompatientinnen. Die Ursachen für die unterschiedlichen T-Zell-Antworten beim CRC und beim Mammakarzinom könnten im spezifischen Tumor-Mikroenvironment oder im lokalen Immunsystem des jeweiligen Ursprungsortes (Brüstdrüse vs. Kolorektalschleimhaut) liegen. Toomey et al. (118) fanden z.B. viele Suppressor-Makrophagen, hohe IL-10-Spiegel und nur schwach aktivierte T Zellen im Mammakarzinomgewebe verglichen mit niedrigen Zahlen an Suppressor-Makrophagen, niedrigen IL-10-Spiegeln und voll aktivierten T-Zellen im CRC. Ein ganz offensichtlicher

Unterschied liegt in der Exposition des CRC gegenüber Bakterien, die durchaus als potente immunologische Adjuvantien bekannt sind (119, 120). Lokale Ursachen im Tumormilieu sind die wahrscheinlichsten Ursachen für diesen Unterschied zwischen CRC und Mammakarzinom. Alternativ könnten auch unterschiedliche Migrationmuster der T-Zellen existieren. Diese Annahme wird durch die Daten von Feuerer et al. (114, 115) gestärkt, die – wie oben berichtet - funktionelle Tumor-spezifische Zellen im Knochenmark aber nicht im Blut von Mammakarzinompatientinnen fanden.

Es ist wenig darüber bekannt, ob zirkulierende, spontane, TAA-spezifische T-Zellen den klinischen Verlauf der Tumorerkrankungen beeinflussen können. In einer Follow-up-Studie (2.3) haben wir 54 CRC-Patienten mittels IFN $\gamma$ -ELISPOT-Assay oder intrazellulärer Zytokinfärbung hinsichtlich der spontanen T-Zell-Antwort gegen die Epitope der TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA untersucht. In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte sich kein Überlebensunterschied zwischen T-Zell-Respondern und T-Zell-Non-Respondern. Dieses Ergebnis muss vorsichtig interpretiert werden, da nur niedrige Patientenzahlen (16 HLA-A2 positive T-Zell-Responder), zur Verfügung standen. Dessen ungeachtet, zeigt die Analyse, dass die getestete spontane T-Zell-Antwort kein wichtiger prognostischer Faktor für das Überleben der CRC-Patienten ist. Eine zweite Einschränkung unserer Studie ist, dass die ausgewählten TAA nur einen kleinen Teil des jährlich wachsenden TAA-Repertoires sind. Verschiedene andere CRC-assoziierte Ag, wie z.B. MUC1 oder p53, oder zusätzliche HLA-bindende Epitope von CEA und her2-neu sind bekannt und stellen weitere, potentielle Zielstrukturen dar (121). Des Weiteren könnte die Frequenz der spontanen T-Zellen (ca. 10-100/1x10<sup>6</sup> PBMC) zu gering sein, um insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung das Tumorstadium zu kontrollieren. Es ist auch möglich, dass die TAA-spezifischen T-Zellen den Tumor nicht erkennen, weil – wie bereits erwähnt – eine HLA-Herunterregulation oder andere „Immune Escape“ Mechanismen stattgefunden haben (122). In diesem Zusammenhang war auch die Rolle regulatorischer T-Zellen (Treg), die zu einer Immunsuppression beitragen können, unklar.

In einer weiteren Studie (2.4), analysierten wir 12 normale Kolonproben und 40 CRC-Proben auf Treg Infiltration mittels immunhistologischer Färbungen des Treg-spezifischen Markers FOXP3. In Übereinstimmung mit Vorarbeiten bei anderen malignen Erkrankungen fanden wir eine erhöhte Treg Infiltration im Tumor. Die Treg Infiltration im Tumor hatte keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung systemischer T-Zell-Antworten beim CRC. Allerdings war

interessanterweise die Treg Infiltration im Tumor signifikant erhöht im limitierten Stadium des CRC, in dem wiederum auch weniger häufig systemische TAA-gerichtete T-Zell-Antworten beschrieben sind. Das legt einen indirekten Zusammenhang zwischen T-Zell-Antwort und Treg Infiltration nahe. Ob eine Migration der Tregs vom Tumor weg während der Metastasierung eine Rolle für die niedrigere Treg Infiltration bei fortgeschrittener Erkrankung spielt, bleibt rein spekulativ.

In einer deskriptiven post-hoc Subset-Analyse nach Stadien-Anpassung fanden wir ein besseres Überleben von Patienten mit höherer epithelialer Treg-Infiltration ( $p=0.04$ ). Diese Daten müssen sehr vorsichtig interpretiert werden, sind jedoch hoch interessant. Unter der Annahme, dass eine höhere Treg Infiltration die Anti-Tumor-Immunität und damit das Überleben reduziert und dass beim Ovarialkarzinom gegensätzliche Befunde erhoben wurden (100-102), erscheinen unsere Daten zunächst überraschend. Es gibt jedoch auch Befunde anderer Autoren, die unsere Beobachtung stützen. Erdman et al. (123) haben gezeigt, dass ein adoptiver Treg-Transfer in Mäuse die Entwicklung von mikrobiell induzierten Kolonkarzinomen signifikant hemmt. In einer Studie zum humanen Hodgkin Lymphom wurde gezeigt, dass niedrige FOXP3(+) Zellzahlen mit einem negativen klinischen Verlauf korrelierten (124). Wir nehmen an, dass Tumor-infiltrierende Tregs einen protektiven Effekt haben könnten, indem sie die Entwicklung eines aggressiven, zytotoxischen und potentiell proliferogenen Zytokinmilieus reduzieren können. Ein solches aggressives Tumorzytokinmilieu ist als Basis für einen Entzündungs-getriggerten Progress maligner Erkrankungen vermutet worden (125, 126). Damit ist erneut die Zweiseitigkeit des Immunsystems in Bezug auf Tumoren, die sich in der Immunstimulation/Immunosurveillance-Diskussion spiegelt, dargelegt. In der genannten Studie (2.4) fanden wir des Weiteren, dass eine hohe CD8-Infiltration stets mit einem besseren Überleben assoziiert war. Allerdings waren diese Daten nicht signifikant. Es gab lediglich einen statischen Trend für ein besseres Überleben bei Patienten mit hoher stromaler CD8 Infiltration. Dieser Befund, der Ergebnisse vorheriger Studien bestätigt, kann eventuell auf eine höhere CD3 und CD8 Infiltration im limitierten Stadien der Erkrankung zurückgeführt werden.

Die Analyse TAA-spezifischer T-Zellen mittels Tetrameren ist eine der etablierten Standardmethoden (30, 39). Allerdings stellt eine geringe Spezifität der Tetramerbindung oft ein Problem dar. In unserer Studie (2.5) haben wir die Ursache der CD8-negativen Tetramer-positiven Zellen untersucht. Die meisten CD8(-) Tetramer(+) Zellen waren CD3(-)CD19(+)CD20(+)CD45RA(+)HLA-DR(+) B-Lymphozyten. Eine Minderheit der

CD8(-) Tetramer(+) Zellen wurde als TCR(+)/CD3(+)/CD4(+)/CD27(+)/CD45RA(+), also als Helfer-T-Zellen identifiziert. Andere mögliche Tetramer-bindende Zellpopulationen konnten durch breite Austestung spezifischer Marker für Monozyten, DC und NK-Zellen ausgeschlossen werden. Insgesamt lag eine unspezifische (zumeist nicht TCR-abhängige, nicht vom Impfstatus abhängige, nicht HLA-restringierte) Bindung der Tetramere an überwiegend TCR-negative Zellen vor. Dies gilt es insbesondere zu beachten, wenn man Tetramere benutzt, um Ag-spezifische (TAA-spezifische, aber auch Virus-spezifische, wie zum Beispiel CMV-spezifische) CD8(+) T-Zellen zu isolieren. Die schlussfolgernde Empfehlung aus den genannten Daten besteht darin, zur Isolation Ag-spezifischer CD8(+) T-Zellen einen Abwurfkanal (dump channel) zu benutzen, über den insbesondere CD19(+) oder CD20(+) B-Lymphozyten und CD4(+) T-Zellen verworfen werden.

Wie bereits ausgeführt, kommt APC respektive MP eine wichtige Rolle bei der Induktion und der Ausrichtung einer Tumor-gerichteten T-Zell-Antwort zu. Auf der Ebene der Ag-Präsentation und der Induktion der T-Zell-Antwort scheint sich zu entscheiden, ob eine Immunantwort tatsächlich gegen den Tumor wirksam wird. DC sind professionelle APC, die entscheidend an der Induktion und Modulation einer T-Zell-Antwort gegen ein Ag beteiligt sind (127). Auch wurden und werden DC zur aktiven spezifischen Immuntherapie im Rahmen von Studien bei malignen Erkrankungen eingesetzt. Dabei zeigten sich zunächst sehr positive Resultate, die sich leider als inkorrekt herausstellten (128) oder bislang leider nicht in großen Studien bestätigt werden konnten (129). Trotz dieser Rückschläge gelten die DC durchaus als geeignet für eine sinnvolle Immuntherapie. Man unterscheidet die DC u.a. nach ihrem Phänotyp und nach ihrer Funktion in reife und unreife DC. Es wird angenommen, dass der Reifungszustand der DC eine wichtige Rolle für eine Vakzine-basierte Immuntherapie spielt. In unserer Studie (2.6) haben wir die Kulturüberstände von DC bezüglich sezernierter Zytokine auf Proteinebene während der DC-Reifung analysiert. Wir konnten frühere Berichte bestätigen und gleichzeitig das Repertoire der bekannten, während der DC-Reifung sezernierten Zytokine erweitern (130-133). Neben der Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle, ist die Zytokinausschüttung eine wesentliche Komponente der DC-Aktivierung. Das ist durchaus verständlich, da Zytokine und Chemokine eine wichtige Rolle in der Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunantwort inklusive der Ag-Aufnahme spielen. Außerdem können Zytokine und Chemokine Zellen der spezifischen Immunantwort in das Zielorgan oder in den Lymphknoten locken. Dieser Schritt könnte eine Voraussetzung für die Initiierung einer T-Zell-Antwort sein. Während der Reifung sezernierten die DC in

unserer Analyse Faktoren für die Regulation der Ag-Aufnahme und die Aktivierung des unspezifischen, angeborenen Immunsystems (TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ ); Lockstoffe (chemo-attractants) für verschiedene Immunzellen, inklusive Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen (MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , IL-8, MCP-1, MDC, RANTES, MIG, IP-10, Eotaxin), und schließlich Zytokine, die T-Zellen aktivieren (IL-2, IL-6, IL-7). Dieses Zytokinprofil reifender DC ist wichtig für die Zubereitung von DC als Mediatoren einer Tumor-gerichteten Immuntherapie. Da die Zytokinproduktion der DC vorübergehend ist und von DC abgeschaltet werden kann (132, 133), ist es vorstellbar, dass die häufig zur Vakzinierung eingesetzten, in vitro gereiften DC bereits vor der Applikation in Bezug auf ihre Chemokin- und Zytokinproduktion erschöpft sind.

MP selbst sind im Tumor-Mikroenvironment einer ganzen Bandbreite von Zytokinen und Chemokinen ausgesetzt. Dabei ist die Entscheidung, ob die Aktivierung der MP eher zur Induktion einer akuten Entzündungsreaktion mit nachfolgender Migration und Aktivierung von Effektorzellen oder zu einer Herunterregulation des Entzündungsprozesses mit einer Eindämmung des Gewebeschadens führt, wesentlich von dem jeweiligen Zytokinumfeld beeinflusst. Wie oben bereits ausgeführt, lassen sich TAMs entweder als "zytotoxisch" (M1) oder als "immunsuppressiv" (M2) beschreiben (65). Deshalb testeten wir, ob eine polarisierte Immunantwort der MP nach einem pathogenen Reiz auf den Einfluss einzelner Zytokine zurückzuführen ist, oder ob es sich mehr um ein generelles Prinzip handelt, MP zu polarisieren; letztlich, ob es einen kontinuierlichen Übergang zwischen den Aktivierungen durch die verschiedenen Zytokine gibt, oder ob es Gruppen von Zytokinen gibt, die durch eine Art molekularen Schalter auf die MP polarisierend wirken. Die beiden Pole werden einerseits durch Inflammationsförderung und andererseits durch Eindämmung der Inflammation dargestellt. In unserer Untersuchung haben wir evaluiert, wie sich die Genexpressionprofile von CD14<sup>+</sup> MP verhalten, wenn diese nach LPS-Stimulation jeweils 42 verschiedenen Immunfaktoren (Zytokine, Chemokine, etc.) ausgesetzt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass MP Aktivierung tatsächlich zumeist ein bipolarer Prozess ist. Anhand der Genexpressionsmuster konnten wir zwei Zytokinhauptklassen identifizieren, die entweder den klassischen (M1, z.B. IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6 und MIP1 $\alpha$ ) oder den alternativen Weg (M2, z.B. IL-4, IL-12, RANTES und TGF $\beta$ ) der MP Aktivierung induzierten. Eine kleinere, dritte Gruppe von Zytokinen um IL-10, IL-13 und IL-15 stellte eine weitere Klasse dar, die wir „alternativ 2“ genannt haben. Hauptsächlich wurden Transkriptionsmuster „down-stream“ einer NF $\kappa$ B Aktivierung mit den Zytokinclassen assoziiert gefunden. Dies legt eine Rolle des

NF $\kappa$ B im Steuerzentrum der MP-Aktivierung/Differenzierung nahe. Dies ist in diesem Fall nicht verwunderlich und sollte auch nicht auf alle MP Aktivierungen übertragen werden, da das LPS-Signal durch TLR-4 and CD14 vermittelt wird, die wiederum direkt den I $\kappa$ B kinase (IKK)-NF $\kappa$ B pathway regulieren (67, 134-136). Da LPS selbst den klassischen Typ der Aktivierung induziert, wurden interessanterweise auch die stärksten Modulationen in Richtung des alternativen Weges gesehen, was am ehesten bedeutet, dass viele Zytokine die proinflammatorischen Effekte pathogener Reize antagonisieren können. Diese gesamte Analyse gibt Informationen über den primären Effekt individueller Zytokine auf MP in der frühen Phase der LPS-Stimulation und zeigt wie die Reifung MP in frühen Stadien der Immunantwort polarisiert wird.

Neben der Zytokin-Makrophagen-Interaktion sind selbstverständlich weitere Mechanismen für die Ausprägung einer Immunantwort wichtig. Die Induktion einer Immunantwort gegen TAA basiert auch auf einer effektiven Epitopräsentation an der Zelloberfläche professioneller APC. Für die Immuntherapie stellen rekombinante Expressionsvektoren einen interessanten Weg zur Präsentation ganzer Ag zur Immunisierung dar. Aufgrund der ausgeprägten kostimulatorischen Eigenschaften der DC, wird der Ansatz, eine Ag-Expression mittels Vektoren in DC zu induzieren, als ganz besonders viel versprechend gesehen. Es ist auch angenommen worden, dass eine Infektion der DC mit viralen Expressionsvektoren zu einer Aktivierung der DC führen würde (137). Da DC-Reifung ein Schritt ist, der vor einem adoptiven Transfer bereits in vitro erfolgen kann, testeten wir zunächst die Sensitivität reifer und unreifer DC für eine rVV Infektion. Insgesamt zeigte sich, dass das rVV die mDC und iDC mit gleicher Effizienz infizieren und die Expression des TAA gp100 induzieren konnte. Grundsätzlich wurde im Zusammenhang mit der viralen Infektion eine Herunterregulation der meisten zellulären Funktionen gesehen - mit einem Trend zu einer verminderten Oberflächenexpression der HLA-Klasse I Moleküle, der kostimulatorischen Moleküle sowie einer reduzierten Zytokinsekretion. Um zu prüfen, ob die rVV-Infektion die Fähigkeit der DC zu Präsentation des endogen prozessierten TAA gp100 beeinflusst, testeten wir die Fähigkeit der rVV-infizierten mDC und iDC, eine TCR-Herunterregulation und eine IFN $\gamma$  Produktion in einem gp100 spezifischen T-Zell-Klon zu bewirken. Wegen der Reduktion der HLA-A\*0201 Expression nach einer rVV Infektion, testeten wir zunächst die Fähigkeit der infizierten DC mittels exogen hinzugegebenem, relevantem Epitop in titrierten Konzentrationen eine TCR-Herunterregulation und eine IFN $\gamma$  Expression in dem spezifischen T-Zell-Klon zu induzieren. Für die Induktion einer T-Zell-Aktivierung wurde ein signifikanter

Unterschied weder zwischen mDC und iDC noch zwischen infizierten und nicht-infizierten DC gefunden. Dies zeigt, dass die Oberflächenverfügbarkeit des HLA in diesem Setting kein wesentlicher, limitierender Faktor zu sein scheint. Interessanterweise, konnte eine viral ausgelöste gp100-Expression keine IFN $\gamma$  Expression und nur eine minimale TCR Herunterregulation induzieren. Um zu testen, ob dieses Stimulationsversagen auf Ag-Prozessierungs-, Ag-Transport- oder Ag-Präsentations-Defekte oder auf eine niedrige HLA-Affinität des natürlichen g209 Epitops zurückzuführen ist, infizierten wir die DC mit rVV, das für ein gp100-Konstrukt mit der g209-2M Modifikation kodierte. Da dies die Fähigkeit der DC zur Induktion einer Stimulation des spezifischen T-Zell-Klons wiederherstellte, schlussfolgern wir, dass rVV-infizierte iDC oder mDC ihre Fähigkeit behalten, endogene Ag zu prozessieren und zu präsentieren, und dass ihre Ag-Präsentationseffizienz wesentlich von den biochemischen Eigenschaften des jeweiligen Peptids abhängt. Es ist durchaus möglich, dass die erhöhte HLA-Bindungsaffinität des g209-2M-Peptids die einzige Erklärung für dieses Phänomen ist (138). Diese Studie zeigte also, dass DC nicht besonders effizient in der Induktion einer HLA-Klasse I-assoziierten Ag-spezifischen Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind, es sei denn, dass ein stark HLA-bindendes Peptid verwendet wird. Dies ist nicht überraschend, da die DC-Funktion auch von der kostimulatorischen Funktion verschiedener Moleküle oder den stimulatorischen Wirkungen freigesetzter Zytokine abhängig ist (131, 139). Im Gegensatz zu anderen viralen Systemen (140) scheinen diese Faktoren in der frühen Phase der rVV-Infektion, wenn die DC noch vital sind, nur minimal beeinträchtigt zu sein. Obwohl für eine rVV-Infektion gezeigt worden ist (141), dass sie die DC-Reifung zu beeinträchtigen vermag, scheint nach unseren Daten die Reifung, wenn einmal erfolgt, nur wenig rückgängig gemacht zu werden. Dies ist wichtig, da eine DC-Reifung als Voraussetzung einer effizienten CD8 T-Zell-Aktivierung gilt (142). Die DC Reifung ist nicht assoziiert mit einer verminderten Transgenexpression. Eine rVV-Infektion kann nach unseren Daten also durchaus nach der DC Reifung erfolgen.

Wie oben ausgeführt ist das g209-Epitop des Melanom-assoziierten Ag gp100 nur durch niedrige bis mittlere HLA-A\*0201-Affinität gekennzeichnet (107). Dieses Epitop ist zwar ein natürliches T-Zell-Target, aber es induziert nur mit geringer Effizienz T-Zell-Antworten während einer Immunisierung. Das ebenfalls erwähnte, modifizierte gp100 Epitop g209-2M, das eine T zu M Substitution an Position 2 des antigenen Nonamers enthält, ist durch eine hohe HLA-A\*0201 Affinität gekennzeichnet; und es induziert starke und teilweise klinisch effektive T-Zell-Antworten. Diese höhere HLA-A\*0201 Affinität wird als einziger Grund für

die gesteigerte Immunität gesehen. In anderen Ag-Systemen hat man allerdings eine unvorhersehbare Beziehung zwischen Affinität und Immunogenität gefunden. Zusätzlich sahen wir in der oben aufgeführten Studie (2.8) einen erheblichen Unterschied zwischen den beiden Epitopen in der Fähigkeit, Immunantworten hervorzurufen. In dieser Folgestudie (2.9) haben wir untersucht, ob zusätzlich zu den Unterschieden in der HLA-Bindungsaffinität, die proteasomale Spaltung für die unterschiedliche Immunogenität von g209 und g209-2M verantwortlich sein könnte. Wir bestätigten experimentell Computervorhersagen, die besagten dass gp100(201-223) weniger Spaltungsstellen aufweist als gp100(209-217T210M). Allerdings konnten die exakten Spaltungsstellen nicht akkurat vorhergesagt werden, und die Vorhersagekonfidenz war aufgrund diskordanter Befunde verschiedener Computeralgorithmen gering. Der korrekte C-Terminus des g209-Peptids wurde in höheren Mengen produziert als der des g209-2M-Peptids. Es wurde allerdings eine stärkere T-Zell-Aktivierung beobachtet, wenn die Bruchstücke des Proteasom-gespaltenen gp100(201-223T210M) verwendet wurden. Dieser Unterschied wurde ebenso gefunden, wenn separat synthetisch hergestellte Nonamere verwendet wurden. Insgesamt scheint also die höhere HLA-Affinität des modifizierten Epitops gp100(209-217T210M) mögliche Unterschiede bei der proteasomalen Spaltung zu kompensieren. Proteasomale Spaltung ist nur ein Faktor im Prozess der Ag-Präsentation. Da die eigentlichen antigenen Nonamere nicht direkt durch das Proteasom produziert wurden, könnten weitere Faktoren, wie post-proteasomale Prozessierung und intrazellulärer Peptidtransport, die Peptidpräsentation beeinflussen. Wegen der relativ ineffizienten proteasomalen Produktion der antigenen Peptide sollten für eine Impfung eher direkt Peptidepitope verwendet werden. Dies gilt auch, weil das Proteasom die Zahl der verfügbaren Peptide limitiert, indem nur ein kleiner Anteil des gesamten Produktes degradiert wird. Die T-M Substitution in gp100 Vakzinen sollte bevorzugt werden, da diese Mutation – wie wir erneut bestätigten – die Bindungsaffinität zum HLA-Molekül (HLA-A\*0201) deutlich erhöht.

Interessanterweise erlauben die Studien, die in den Abschnitten 2.8 und 2.9 dargestellt sind, auch die Erweiterung des Methodenspektrums in der Analyse Ag-spezifischer T-Zell-Antworten. Die Standard ex vivo Methoden ELISPOT, Tetramer und IC-FC nutzen ein Peptidepitop als „bekannt“ immunogen um die „unbekannte“ Zahl entsprechend spezifischer T-Zellen zu finden. Man kann dieses Prinzip auch umkehren und die Reaktion bekannter T-Zellen zur Analyse einer „unbekannten“ Immunogenität von Peptiden nutzen. Wir haben dazu bekannte Epitop-spezifische T-Zell-Klone genutzt und sie mit ihrem nativem Epitop und

einem modifizierten Epitop stimuliert. Wir konnten zeigen, dass bei dem gp100-spezifischen T-Zell-Klon JR6C12 (143), der als repräsentativer Klon Melanom-spezifischer T-Zell-Klone gilt, die IFN $\gamma$ -Expression auf Proteinebene und die Herunterregulation des TCR gut korrelieren, und dass die TCR-Herunterregulation die sensitivere Methode zur Messung der T-Zell-Aktivierung darstellt. Entsprechend der IFN $\gamma$ -Expression und der TCR-Herunterregulation konnten wir die Immunogenität von verschiedenen Nonameren und von proteasomal gespaltenen Peptidmischungen vergleichen. Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde mit weiteren T-Zell-Klonen bestätigt.

Das eigentliche Ziel der Bemühungen, T-Zell-Antworten zu analysieren, Prozesse der DC-Reifung, der Aktivierung von MP sowie der Ag-Präsentation zu verstehen, liegt in der rationalen Entwicklung klinisch erfolgreicher Immuntherapien. Studien zur Vakzinetherapie sind bislang bei vielen verschiedenen malignen Erkrankungen durchgeführt worden. Wir haben in einer Übersichtsarbeit die klinische und immunologische Ansprechrate unter aktiver spezifischer Immuntherapie beim metastasierten CRC erarbeitet. Zweiunddreißig Studien mit über 500 CRC-Patienten wurden eingeschlossen. Wir fanden eine objektive klinische Ansprechrate von 0,9%. Diese Zahlen stimmen mit Daten von Rosenberg et al. (79) überein, die eine objektive Ansprechrate von etwa 3% bei geimpften Patienten, überwiegend mit Melanom, berichten. Neben der objektiven Ansprechrate fanden wir in unserer Übersicht eine klinische Benefitrate (CBR: komplette Remission, partielle Remission, mixed und minor response, sowie Krankheitsstabilisierung zusammengenommen) von 11,2%. Obwohl objektive Ansprechraten natürlich der bevorzugte Endpunkt klinischer Studien sein müssen (79), kann man die so genannten weichen Kriterien (wie mixed response oder Krankheitsstabilisierung) nicht komplett ignorieren, weil das Risiko bestünde, kleine Vorteile, die sich zu einem klinisch relevanten Vorteil summieren könnten, zu ignorieren. In einer post hoc Analyse untersuchten wir, welche Vakzinepräparation oder Applikationsroute die beste CBR bringen würde. Wir fanden eine CBR von 46% bei Patienten, die mit autologem Tumor geimpft worden waren, gefolgt von Patienten nach DC-basierter Impfung (17% CBR) und Peptid-basierter Impfung (13% CBR). Diese explorativen Daten müssen vorsichtig interpretiert werden, insbesondere da viele hier eingeschlossene Studien keine gut definierten Kriterien für mixed/minor Response und Krankheitsstabilisierung benutzt haben. Insgesamt sprechen die Daten am ehesten für den Einsatz einer Multiepitopvakzine und für eine individualisiertere Immuntherapie. In starkem Gegensatz zu der minimalen klinischen Ansprechrate stehen immunologische Ansprechraten von etwa 50%. Subsetanalysen zeigten

keine substantiellen Unterschiede in der Immunantwort zwischen den verschiedenen Vakzinen und Applikationsrouten. Auch die immunologischen Daten müssen vorsichtig interpretiert werden, da sie mit einer großen Zahl verschiedener Assays in verschiedenen Laboren erhoben wurden. Nichtsdestotrotz geben sie einen guten Anhaltspunkt, in welchem hohem Maße Immunantworten induziert werden können. Die wichtigsten Fragen, die sich aus dieser Übersichtsarbeit ergeben, sind: Warum gelingt durch aktive spezifische Immunisierung, trotz Induktion guter Immunantworten, kein klinisches Ansprechen? Sind wir überhaupt auf dem richtigen Weg, die aktive spezifische Immuntherapie bei malignen Erkrankungen zu verwenden? Ist eine Immunantwort von etwa 50% ohne harte Zeichen eines klinischen Ansprechens Grund genug, diese Form der Immuntherapie fortzusetzen? Ich denke es ist lohnend, die aktive spezifische Immuntherapie als Option für Patienten mit malignen Erkrankungen weiterzuentwickeln: 1.) sie hat eine geringe Toxizitätsrate, 2.) sie hat einige kleine klinische Erfolge gezeigt, die als „proof of principle“ dienen, 3.) sie kann uns helfen, die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem besser zu verstehen und somit auch für andere Immuntherapien sinnvoll sein, so z.B. für den adoptiven Transfer in vitro expandierter TAA-spezifischer T-Zellen, der mit 50% klinischer Ansprechrate in einem ersten kleinen Patientenkollektiv erfolgreich getestet wurde (83, 144). Es gibt noch einen weiteren, 4.) Grund, die Erforschung der aktiven spezifischen Immuntherapie fortzusetzen: Obwohl klinisches Ansprechen in metastasierter Situation sehr selten ist, zeigen Studien in der adjuvanten Situation des CRC viel versprechendere Ergebnisse in einigen Subgruppen von Patienten (145-148). Allerdings sollten unsere Erwartungen an die aktive spezifische Immuntherapie nicht zu hoch sein, insbesondere wird sie wohl sobald keine entscheidende klinische Effektivität bei Patienten mit großer Tumorlast zeigen. Es gibt eine Vielzahl von Ansatzpunkten, an denen die Vakzinetherapie verbessert werden könnte. Es wäre sicherlich hilfreich, die Immunantwort auch im Zielorgan, also im Tumor, und nicht nur im Blut zu analysieren. Wir können gewisse Fortschritte bei der Entdeckung neuer Epitope und neuer Tumorantigene erwarten. Des Weiteren brauchen wir ein besseres Verständnis der einzelnen T-Zell-Funktionen, wie z.B. T-Zell-Avidität und T-Zell-Homing. Auch ein besseres und genaueres Verständnis der Interaktionen zwischen Tumor, Stroma, T-Zellen, Treg, DC und anderen Komponenten des Immunsystems wird Eingang in die Weiterentwicklung der Vakzinen finden. Obwohl Patienten mit fortgeschrittenem CRC bislang nicht substantiell von einer Vakzinierung profitiert haben, wissen wir zu wenig, um unsere Bemühungen in dieser Richtung nicht fortzusetzen. Ich gebe den Autoren Recht, die es ungerechtfertigt finden, die

Weiterentwicklung aktiver spezifischer Immuntherapien aufzugeben (80), wengleich noch viel zu tun ist, um diese Art der Therapie zu einem klinischen Erfolg zu führen.

Die Diskussion um Immunstimulation und Immunosurveillance ist bei weitem nicht entschieden. Im Gegenteil, die Diskussion geht mit vertieftem Wissen intensiviert weiter. Es erscheint am ehesten so, dass beide Theorien richtige Ansätze haben. Eine partielle Synthese könnte in der Immunoediting-Theorie liegen, die im zeitlichen Verlauf einer Tumorerkrankung teils gegensätzliche Funktionen des Immunsystems vermutet. Zwar haben spontane und Vakzine-induzierte TAA-spezifische T-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf den klinischen Verlauf des CRC, aber es wird auch klar, dass das Immunsystem ein großes therapeutisches Potential hat. Für eine erfolgreiche Weiterentwicklung einer aktiven spezifischen Immunisierung ist es nötig, Schritt für Schritt vorzugehen: das richtige Ag, das richtige Epitop, das richtige Zytokinmilieu im Tumor, die richtigen APC, die richtigen Adjuvantien, die richtigen T-Zellen. Dazu leistet die vorliegende Arbeit kleine Beiträge, viel Arbeit bleibt.