

1 EINLEITUNG

1.1 Immunantwort gegen Tumoren

Bereits zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts wurde ein Zusammenhang zwischen Melanominfiltrierenden Leukozyten und regressiven Veränderungen der Tumoren beobachtet (HARDLEY 1907). Nachdem bereits 1957 von Burnet vermutet wurde, dass Tumoren aufgrund ihrer Antigene eine effiziente Immunreaktion provozieren (BURNET 1957) wurde 1970 der Begriff der „Immunüberwachung“ maligner Tumoren durch das Immunsystem geprägt und bereits damals wurde spekuliert, dass diese „Immunüberwachung“ die Funktion von Lymphozyten ist (BURNET 1970). Für einen Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und malignen Erkrankungen gibt es viele direkte und indirekte Hinweise. So wird in immunsupprimierten Organismen gehäuft die Entwicklung maligner Tumoren beobachtet: Bei HIV-Infizierten treten vermehrt Kaposi-Sarkome, Virusinduzierte Tumoren und Lymphome auf (BOSHOF 2002). Ebenso steigt die Inzidenz von Tumorerkrankungen bei immunsuppressiver Therapie (LEVINE 1994, HSIEH 1999, LINDELOF 2000). Nach Absetzen der Therapie kann z.T. eine Rückbildung der Malignome beobachtet werden (STARZL 1984). Weiterhin sind v.a. für das Maligne Melanom und das Nierenzell-Karzinom schon früh einzelne Krankheitsverläufe mit Spontanremissionen sehr detailliert beschrieben worden (LUDWIG 1977).

Neben diesen klinischen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass bei vielen Patienten eine Immunantwort gegen den Tumor besteht. Dabei spielen CD8+ T-Zellen eine wesentliche Rolle. Im Gewebe unterschiedlicher Tumorentitäten konnte nach histologischer Aufbereitung Lymphozyten nachgewiesen werden, die als Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TIL) bezeichnet wurden (ITHO 1988, BELLDEGRUN 1988, KAWAKAMI 2000). Durch weitergehende Untersuchungen wurde gezeigt, dass es sich um CD8+ T-Zellen handelt, die HLA-Klasse-I-restringiert Tumorzellen der autologen Zelllinie in vitro lysieren (MUKERJI 1989, TOPALIAN 1989, YANELLI 1996). Inzwischen konnten bei unterschiedlichen Tumorentitäten auch im peripheren Blut zirkulierende TAA-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (LEE 1999, LETSCH 2000, KARANIKAS 2001, SCHEIBENBOGEN 2002 (c), VALMORI 2002).

Auf der anderen Seite verfügen maligne Tumoren über eine Vielzahl sog. Escape-Mechanismen, die es ihnen ermöglichen, sich der Abwehr durch immunkompetente T-Zellen zu entziehen: Durch Mutationen, Verlust Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) oder von MHC-Komplexen können sich Tumorzellen der Kontrolle durch Effektorzellen entziehen (CABRERA 1996, CORMIER 1998, RIKER 1999, KOOPMAN 2000, KONTANI 2001). Ein Verlust der Transporterproteine, die mit der Antigenpräsentation assoziiert sind (TAP) resultiert ebenfalls in Reduktion bzw. Ausbleiben der Antigen-Präsentation (CROMME 1994, KORKOLOPOULOU 1996, SELIGER 1997). Durch mangelnde Expression kostimulatorischer Moleküle vermögen Tumorzellen Anergie in tumorspezifischen T-Zellen zu induzieren (VON LEOPRECHTING 1997, KOYAMA 1998), darüber hinaus können Tumoren in infiltrierenden dendritischen Zellen (DZ) die Expression von CD80 und anderen kostimulatorischen Molekülen reduzieren (CHAUX 1996). FasL-Expression der malignen Zellen vermag die Apoptose aktivierter CD8⁺-Lymphozyten zu induzieren (WHITESIDE 1998). Weiterhin schaffen Tumorzellen durch Sekretion von Zytokinen, wie TGF β und Interleukin 10 (IL 10) und anderen Mediatoren, wie Histamin ein Mikroklima, das u.a. die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten unterdrückt (Zusammenstellung bei MÜLLER 2002).

1.2 Antigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität

In den vergangenen zwei Jahrzehnten ist es gelungen, viele Details der Aktivierung und Effektorfunktionen von T-Lymphozyten zu erklären. Die Zielzellen der T-Zell-vermittelten Immunantwort sind typischerweise infizierte und maligne transformierte Zellen. Mit hoher Sensitivität werden die Zielzellen spezifisch erkannt und eliminiert. Lymphozyten binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) an einen Peptid-MHC-Komplex, wobei CD4⁺ Zellen mit den auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimierten MHC-Klasse-II-Komplexen interagieren und CD8⁺ Zellen an ubiquitär vorkommenden MHC-I-Komplexen binden (ZINKERNAGEL und DOHERTY 1974, RAMMENSEE 1996). Jedes zytosolische Protein einer Zelle wird durch intrazelluläre Proteasomen in Peptidfragmente gespalten, die durch spezielle Peptidtransportmoleküle, sog. TAPs in das endoplasmatische Retikulum geschleust werden (HEEMELS 1995, OHNMACHT 2000, REITS 2003). In diesem Kompartiment warten bereits „leere“ MHC-Klasse-I-Komplexe, die nach Bindung der Peptide an die Zelloberfläche

transportiert werden (LEHNER 1996). Dort werden die Antigen-MHC-Komplexe von den zirkulierenden Effektorzellen erkannt.

Die Zielzellen präsentieren ihr Antigen den CD8⁺ T-Zellen als Okta-, Nona- oder Dekapeptide, gebunden in einer eigens dafür vorgesehenen Furche des MHC-Komplexes. Nach zunächst antigen-unabhängiger Bindung der Effektorzellen an die potentielle Zielzelle durch Adhäsionsmoleküle werden die Effektorfunktionen nach antigenspezifischer Interaktion zwischen TZR der CD8⁺ Zelle und Antigen-MHC-I-Komplex der Zielzelle induziert. Bei antigen-spezifischer Bindung des TZR werden die Effektorfunktionen ausgelöst. Nach Verstärkung der Zellbindung durch Organisation des T-zellulären Zytoskeletts spielen sich jegliche Effektorfunktionen an den kontaktierenden Membranen ab, so dass bei Konzentration der Zytotoxizität auf die Zielzelle die Nachbarzellen geschont werden. Zytotoxizität wird durch zwei Mechanismen vermittelt: zum einen durch membrangebundene Interaktion von Fas und Fas Ligand (FasL) und TRAIL (STRASSER 2000), beide Angehörige der TNF-Rezeptor-Familie, zum anderen durch Exozytose von Perforinen und Granzymen (TRAPANI 1999) aus intrazellulären Granula: Perforine polymerisieren in der Membran der Zielzelle zu Poren. Diese ermöglichen das Eindringen von Serinproteasen, den Granzymen, die durch die Aktivierung einer intrazellulären Kaspase-Kaskade Apoptose vermitteln (SMYTH 1995).

Ein weiterer Wirkmechanismus zytotoxischer antigenspezifischer T-Zellen ist die Sekretion von Zytokinen. Entsprechend ihrem Zytokinrepertoire wird zwischen T_H1- und T_H2-Zellen unterschieden (MOSMANN 1986). T_H1-Zellen sezernieren IL-2, IFN γ und TNF α unmittelbar nach Konfrontation mit dem Antigen. Insbesondere IFN γ entfaltet eine Vielzahl von Wirkungen auf die Zielzelle: In virusinfizierten Zellen wird die virale Replikation gehemmt (SURI 2001). IFN γ verstärkt die Präsentation von viralen und Tumorzell-Antigenen durch Vermehrung der MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche (SELIGER 1997, AROSARENA 1999), ebenso wird die Synthese und Aktivität der TAPs in den Zielzellen gesteigert (SIJTS 2001). Das Zytokin wirkt zudem auf Monozyten, aktiviert ihre Differenzierung zu Makrophagen und induziert die Entwicklung zu professionellen Antigenpräsentierenden Zellen. Auch die Aktivität von CD8⁺ Zellen und natürlichen Killer (NK)-Zellen wird durch IFN γ gesteigert. Weiterhin induziert IFN γ in den Zielzellen den Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus und löst Apoptose in den Tumorzellen aus (TRUBIANI 1994, BROMBERG 1996, KAPLAN 1998, FARRAR 1999).

Auch durch indirekte Mechanismen wie die Induktion der Angiogenese-Inhibitoren IP10 und Mig hemmt IFN γ das Wachstum maligner Zellen, da durch mangelnde Vaskularisierung die Versorgung des Tumors unterbunden wird und außerdem IP10 und Mig chemotaktisch auf CD8 $^+$ T-Zellen wirken (SUN 2001). Auch die Zytokine IL-4 und IL-5 der Tc2-Lymphozyten besitzen gegen Tumorzellen gerichtete Wirkungen. U. a. wird die Antigenpräsentation der Zielzelle verstärkt und das Tumorwachstum in vivo unterdrückt (DOBRZANSKI 2000).

Nach Interaktion mit der Zielzelle werden viele Effektorzellen apoptotisch, erleiden den sog. „Aktivierung-induzierten-Zelltod“ (MAHER 2002). Ein Teil der Effektorzellen entwickelt sich jedoch zu Gedächtniszellen, aus denen bei neuerlicher Antigenkonfrontation innerhalb weniger Stunden aktivierte Effektorzellen rekrutiert werden können (KAECH 2002).

Wie kommt es aber zur Aktivierung naiver CD8 $^+$ Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen? Die Entwicklung naiver T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen, ein Prozess, der im Englischen mit „priming“ bezeichnet wird, unterliegt strengen Regeln. Er vollzieht sich in den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Tonsillen etc.) und erfordert neben der Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes durch den TZR, auch die Interaktion kostimulatorischer Moleküle (LANZAVECCHIA 1998 (b) und 1999). Lediglich aktivierte und reife DZ können als professionelle APZ naive Zellen „primen“. Die Reifung von DZ wird durch Virusinfektion, bakterielle Lipopolysaccharide oder auch durch Zytokine, wie TNF α induziert. Besonders effizient erfolgt die Aktivierung der DZ jedoch durch CD4 $^+$ Helferzellen: Neben der Bindung des TZR an den Antigen-MHC-II-Komplex interagieren auch CD40 auf der DZ mit CD40-Ligand auf der CD4 $^+$ Zelle. Dadurch kommt es zu einer Stimulation der DZ, die zu einer gesteigerten Expression von Antigen-MHC-Komplexen, sowie kostimulatorischen Molekülen führt (MATZINGER 1989, LANZAVECCHIA 1998 (a) und (b)), als deren wichtigste B7.1 und das verwandte B7.2 zu nennen sind, die mit CD28 auf den ruhenden T-Zellen interagieren (Übersichtsarbeit von SHARPE 2002) Die dadurch induzierte Sekretion von IL-2 und gleichzeitige IL-2-Rezeptor-Expression der Lymphozyten führt zu ihrer Proliferation und Differenzierung zu aktivierten Effektorzellen (GIMMI 1991). Nach der Aktivierung, die neben dem Bereitstellen von zytotoxischen Mediatoren auch mit einer Veränderung der Oberflächenmoleküle einhergeht, sind die Zellen befähigt, bei TZRBindung in der Peripherie auch ohne Kostimulation eine Effektorreaktion auszulösen (LANZAVECCHIA 1998 (a)).

Jedoch führt eine initiale Bindung des TZR an seinen spezifischen MHC-Antigen-Komplex in Abwesenheit kostimulatorischer Moleküle zu Anergie der betreffenden Zelle (APPLEMAN 2003). Neben intrazellulär synthetisierten Peptiden wie bei Virusinfektionen können DZ auch exogene Antigene über MHC-I-Komplexe präsentieren und so auch bei Tumorerkrankungen zu suffizienter Stimulation von CD8⁺ Effektorzellen führen: apoptotische Tumorzellen werden von DZ phagozytiert und nach intrazellulärer Prozeption über MHC-I-Komplexe präsentiert, so dass ein Priming zytotoxischer T-Zellen erfolgt (ALBERT 1998, JENNE 2002).

Eine weitere Lymphozyten-Subpopulation sind die natürlichen Killer-(NK)-Zellen: Sie vermögen Zielzellen ohne vorherige Immunisierung oder Aktivierung und unabhängig von MHC-präsentierten Antigenen zu lysieren (MORETTA 1996, LANIER 1998). NK-Zellen vermitteln Zytotoxizität entweder über ihre Vielzahl komplex regulierter Rezeptoren oder Antikörper abhängig durch Bindung von CD16 an den Fc-Terminus zellgebundener Antikörper (VIVER 1991, STAHL 1992). Drei Rezeptorgruppen erkennen die Zielzellen direkt und vermitteln spezifische Lyse. Aktivierende Rezeptoren erkennen ubiquitäre membranständige Oligosaccharide als Liganden und lösen die zytotoxische Antwort aus (Übersicht in BARAO 1998). Inhibitorische Rezeptoren erkennen die eigenen HLA-Klasse-I-Moleküle auf den Zielzellen und unterbinden die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (BORREGO 2001, SAWICKI 2001). So werden z.B. Tumorzellen, die im Rahmen von Escape-Mechanismen ihre MHC-Komplexe verlieren, Opfer von NK-Zellen (Übersichtsarbeiten von GARCIALORA 2003, MORETTA 2003).

1.3 Phänotyp und Subpopulationen von T -Zellen

Die Entwicklung moderner Methoden zum Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen in den vergangenen Jahren ermöglicht es, simultan funktionelle Parameter und phänotypische Charakteristika der spezifischen Lymphozyten darzustellen. Kürzlich wurden, basierend auf der Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA, eine die Signalvermittlung über den TZR verstärkende Tyrosinphosphatase und CCR7, einem Lymphknoten-Homing-Rezeptor, vier Subpopulationen von CD8⁺ T-Lymphozyten definiert, die sich bezüglich ihrer Differenzierungsstadien und funktionellen Eigenschaften unterscheiden. Naive T Zellen

exprimieren sowohl CD45RA, als auch CCR7. Im Gegensatz dazu sind Gedächtniszellen durch Abwesenheit von CD45RA charakterisiert. Abhängig von der CCR7-Expression auf der Zelloberfläche werden die CD45RA- Gedächtniszellen weiter in CCR7+ sog. „zentrale“ und CCR7- „Effektor“-Gedächtniszellen unterschieden. Die vierte CD8+ T Zell-Subpopulation wird durch die Expression von CD45RA auf der Zelloberfläche beschrieben, wobei weder CCR7, noch CD27 oder CD28, Liganden kostimulatorischer Moleküle auf der Zelle nachgewiesen werden können (APPAY 2002 (a)). Diese Population, die Effektorzellen, sind befähigt in entzündetes Gewebe zu migrieren, um dort zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen zu entfalten (HAMANN 1997, SALLUSTO 1999, CAMPBELL 2001). Auf den naiven und Gedächtniszellen findet sich außerdem CD62L, ein anderer Lymphknoten-Rezeptor (HAMANN 1997, SALLUSTO 1999). Im Gegensatz zu naiven Lymphozyten synthetisieren Effektorzellen und Gedächtniszellen IFN γ . Zytotoxische Mediatoren Granzym B und Perforin, sowie CD95 Ligand (FasL), ein Apoptose induzierender Mediator gehören ebenfalls zum Repertoire der CCR7-CD8+ Zellen (HAMANN 1997, 1999, HÖFLICH 1998, SANDBERG 2001). Eine detaillierte Zusammenstellung phänotypischer Charakteristika der unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen ist in **Tabelle 1.1** wiedergegeben.

Tab. 1.1 Übersicht über die wichtigsten Unterscheidungskriterien und Funktionen von CD8+ Lymphozyten; nach HAMANN 1997, 1999, HÖFLICH 1998, SALLUSTO 1999, APPAY 2002 (a)

		Naive	Effektor	Gedächtnis	
				Zentrale	Effektor
Lymphozytenmarker	CD3+CD8+	+	+	+	
	CD45RA	+	+	-	
	CD45R0	-	-	+	
Aktivierung+Kostimulation	CD27	+	-	+	
	CD28	+	+/-	+	
	CD57	-	++	-	
	CD58	(+)	++	++	
	CD69				
	CD95	-	+	++	
	FasL	-	++	(+)	
Integrine	CD11a	(+)	++	+	
	CD11b	-	++	-	
	CD18	(+)	++	+	
	CD29	+	++	+	
	CD49d	(+)	++	+	
	CD49e	(+)	++	+	
LK-Homing	CD62L	++	(+)	+	-
	CCR7	++	-	+	-
Zytokine	IL2	+	-	++	+
	IL4	-	-	-	++
	IFN γ	-	++	+	++
	TNF α	-	++	++	
Zytotoxische Mediatoren	Perforin	-	++	(+)	
	Granzym B	-	++	(+)	
Proliferation durch IL -2			+		

Von großem Interesse ist der Phänotyp und die Effektorfunktionen TAA und Tumorzell-reaktiver T-Zellen bei der Erforschung der Tumor-gerichteten Immun-Antwort, insbesondere aber auch bei der Etablierung von Immuntherapien bei Tumorerkrankungen. In verschiedenen Arbeiten wurden in den letzten Jahren der Phänotyp Tumorgerichteter T-Zellen untersucht. Vor allem beim Melanom, welches eine sehr immunogene Tumorentität darstellt, wurde der Phänotyp tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) und melanomspezifischer zirkulierender Lymphozyten charakterisiert. MelanA-reaktive T-Zellen, die in 10-75% aller Melanompatienten nachgewiesen werden können (SCHEIBENBOGEN 1997 (b), PITTET 1999, DHODAPKAR 2000, GRIFFIOEN 2001), wurden sowohl im Tumor als auch in der Peripherie untersucht. Die TIL erwiesen sich dabei zu 95% als Effektor- und Gedächtniszellen, wohingegen die zirkulierenden Lymphozyten vor allem einen Naiven Typ darstellten (PITTET 1999 und 2002). Von anderen Autoren wurden Tyrosinase-spezifische T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen, die zwar einen Effektorphänotyp besaßen, funktionell aber inaktiv waren (LEE 1999). Letsch konnte bei zwei Patienten zeigen, dass zirkulierende, gegen HLA-Klasse-I-idente Melanomzellen reaktive T-Zellen sowohl unter den Effektor- als auch unter den Gedächtniszellen vorkommen (LETSCH 2000). Auch gegen andere Tumor-Entitäten gerichtete T-Zellen wurden bezüglich ihres Phänotyps charakterisiert. So konnten kürzlich gegen das WT1-Tumorantigen gerichtete T-Zellen von AML-Patienten mit Effektor-Typ nachgewiesen werden (SCHEIBENBOGEN 2002 (c)) und bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnten CEAreaktive Effektorzellen identifiziert werden (NAGORSEN 2001).

1.4 Tumorassoziierte Antigene

Da T-Zellen eine zentrale Rolle bei der immunologischen Kontrolle von Tumoren spielen, stellte vor über zehn Jahren die Entdeckung des ersten humanen, von CD8⁺ T-Zellen erkannten TAA, MAGE-1, einen Durchbruch in der Tumorummunologie dar (VAN DER BRUGGEN 1991). Zuvor konnten auf Mäusetumorzellen erste nicht virale Tumorantigene identifiziert werden (LURQUIN 1989, DE PLAEN 1988). Während zunächst nur die Charakterisierung von TAAs möglich war, gegen die bereits ZTLs etabliert worden waren (VAN DEN EYNDE 1989, WÖLFEL 1993), konnten in den letzten Jahre effiziente Strategien entwickelt werden, TAAs zu entdecken, so z.B. die „reverse Immunologie“, wie im folgenden weiter ausgeführt wird. Fünf

verschiedene Gruppen TAAs können unterschieden werden, die Differenzierungsantigene, überexprimierte Antigen, sog. „CancerTestis“-Antigene, mutierte Antigene und virale Antigene (BOON 1997, COULIE 1999, RENKVIST 2001):

Die erste Gruppe bilden die sog. „Cancer-Testis“- oder Tumor-Hoden-Antigene. Die Gene, die diese antigenen Proteine kodieren werden in Zellen adulten, gesunden Gewebes ausschließlich in Hoden und Plazenta exprimiert.

Als zweite Gruppe sind die Differenzierungsantigene zu nennen. Es handelt sich um Proteine, die ausschließlich im Ursprungsgewebe der Tumoren synthetisiert werden, wie Tyrosinase in Melanozyten und Melanomzellen oder Prostataspezifisches Antigen in der Prostata.

Drittens führen Punktmutationen in der Gensequenz ubiquitär exprimierter Proteine zu antigenen Epitopen. Diese Antigene treten in diversen Tumoren unterschiedlicher Ursprungsgewebe auf. In einigen Fällen ziehen sie Funktionseinbußen der ursprünglichen Proteine nach sich, wodurch diese Proteine oftmals eine direkte onkogene Bedeutung besitzen.

In der vierten Gruppe finden sich Epitope von Proteinen, die zwar auch in gesundem Gewebe exprimiert werden, in Tumorgewebe aber um ein Vielfaches überexprimiert sind.

An fünfter Stelle sind virale Epitope zu nennen. Einige Viren besitzen onkogene Funktion. Die von ihnen induzierten Tumoren präsentieren dann virale Epitope. Beispiele sind HPV16-Infektionen beim Zervixkarzinom oder EBV-Antigene bei Virusinduzierten Lymphomen.

Eine detaillierte Liste der jeweiligen TAA-Untergruppen ist in Tab. 1.2 wiedergegeben. (nach COULIE 1999, MOIGNEON 2001, RENKVIST 2001).

Tab. 1.2 Übersicht über die fünf TAA-Gruppen und einige Beispiele der häufigsten TAA

Tumor-Hoden	Differenzierung	Mutationen	Überexpression	Virale Peptide
MAGE	Tyrosinase	CDK4	HER2/neu	HPV
BAGE	MelanA/MART1	MUM 1	PRAME	EBV
GAGE	Gp100	MUC 1	P53	HCV
RAGE	PSA	β -Catenin	Survivin	
GnT-V	TRP1 und 2	HLA-A2	Proteinase3	
Mucine	PSMA	CASP-8	Galektin4 und 9	
NY-ESO-1	PSH-P1	KIAA0205	Karboanhydrase	
CAMEL	GnT-V	Bcr-abl	Aldolase A	
SCP 1		p53	CEA	
SSX 2		β -Catenin	AFP	

Die Identifizierung von TAA erfolgt mit molekulargenetischen Methoden. Klassischerweise werden nach Anlage einer cDNA-Bank aus der RNA der zu untersuchenden Tumorzelllinie Plasmide synthetisiert, die in spezielle Zelllinien transfiziert werden. Die relevanten Antigene werden durch zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL)-Klone nachgewiesen. Anschließend kann das isolierte Gen durch Vergleich mit bekannten Sequenzen aus normalem Gewebe oder anderen Tumoren näher charakterisiert werden. Einen neueren, sehr eleganten Ansatz stellt die SEREX-Methode dar: Nach Anlage einer cDNA-Bank und deren Transfektion in Zellen erfolgt die Zugabe von Patientenserum. Im Serum vorhandene Antikörper gegen die exprimierten Epitope binden spezifisch und werden sekundär sichtbar gemacht (SAHIN 1997, MISCHO 2003). Ein anderer Ansatz zur TAA-Identifizierung ist die „reverse Immunologie“ (BOON 1997): Ausgehend von der Aminosäure (AS)-Sequenz des fraglichen Proteins werden unter Berücksichtigung von Ankermotiven für die HLA-Bindung mögliche Peptide synthetisiert. Die MNZ gesunder Probanden werden mit den Peptiden restimuliert. Die so induzierten T-Zell-Klone lysieren sowohl Peptidbeladene Zellen, als auch die fragliche Tumorzelllinie im Gegensatz zu Zellen, auf denen das Peptid nicht präsentiert wird (OKA 2000, BELLANTUONO 2002). In der SYFPEITHI-Datenbank (RAMMENSEE 1999) sind alle bekannten MHC-Klasse-I und -II-Liganden und Peptid-Motive des Menschen und zahlreicher anderer Arten aufgelistet. Diese im

Internet abrufbare Datenbank (www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/) bietet darüber hinaus die Möglichkeit, mittels eines Algorithmus Kandidatenepitope für eine begrenzte Anzahl von HLA I-Molekülen vorherzusagen.

1.5 Immuntherapie von malignen Erkrankungen

Maligne Erkrankungen durch Stimulation des Immunsystems zu kontrollieren ist keine neue Idee. Erste Ansätze wurden bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts entwickelt, indem Bakterienextrakte (COLEY 1893), Bacille-Calmette-Guerain (BCG) Instillationen bei Blasen-Karzinomen (MORALES 1976) bzw. beim Malignem Melanom Korynebakterium parvum (LIPTON 1991) zur Stimulation der Tumor-spezifischen Abwehr eingesetzt wurden. Immuntherapien zur Behandlung maligner Erkrankungen erscheinen aus unterschiedlichen Gründen sehr attraktiv: Es handelt sich um Therapien mit geringer systemischer Toxizität, die sowohl gegen den Primärtumor, als auch gegen Metastasen eine Tumorspezifische Reaktion induzieren. Darüber hinaus soll therapeutisch eine dauerhafte Gedächtnis-Immunität etabliert werden, die Rezidive verhindert (MOINGEON 2001). Zur Zeit ist noch nicht vollständig bekannt, wie eine Tumor-gerichtete Immun-Antwort beschaffen ist. Es existiert aber eine Vielzahl von Hinweisen, dass sowohl die humorale Abwehr, als auch zelluläre Reaktionen im CD8+-Kompartiment und auch in der CD4+ Subpopulation beteiligt sind. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde die Entwicklung zellulärer Immuntherapien insbesondere durch die Erforschung der TAAs durch die Arbeitsgruppen von Thierry Boon und Steve Rosenberg vorangetrieben (BOON 1992). Verschiedene Therapiestrategien werden verfolgt:

Monoklonale, gegen Epitope maligner Zellen gerichtete Antikörper finden als passive Immuntherapie therapeutische Verwendung bei verschiedenen Tumorentitäten. Aufzuzählen sind Rituximab®, ein gegen CD20 gerichteter Antikörper, der bei der Therapie maligner BZell-Lymphome eingesetzt wird (COHEN 2003) oder Herceptin®, ein Antikörper, der an das beim Mammakarzinom und einigen anderen epithelialen Tumoren überexprimierte Her2/neu bindet (UNTCH 2003). Zum einen bewirken die Antikörper selber eine Tumorlyse, zum anderen werden die Antikörper beim sogenannten „AntibodyEngineering“ als Vehikel eingesetzt: An den Fc-Terminus werden radioaktive oder pharmakologische Substanzen gekoppelt, die nach

spezifischer Bindung des Antikörpers im Tumor akkumulieren bei geringen systemischen Konzentrationen.

Im Rahmen der unspezifischen Immuntherapie kommen Zytokine in z. T. sehr hohen systemischen Dosen bei der Therapie solider Tumoren zum Einsatz (MARINCOLA 1995). Bislang konnte in klinischen Studien die therapeutische Wirksamkeit von IL-2 (WHITTINGTON 1993), IFN γ (AULITZKY 1989, KEILHOLZ 1997 und 2000) und TNF α (LEGHA 1986) belegt werden. Mit anderen Zytokinen, wie IL-4 (LOTZE 1992), IL-12 (ATKINS 1996) und M-CSF (REDMAN 1992) konnten keine oder nur sehr geringe therapeutische Effekte erzielt werden. Ferner finden Zytokine auch als Adjuvantien in der spezifischen Immuntherapie Anwendung.

Durch Vakzinierungen erfolgt die aktive spezifische Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort bei Tumorpatienten. Bestrahlte Tumorzellen oder Tumorzell-Lysate (ROSENBERG 1999, GRETEN 1999, SINKOVICS 1991), v.a. aber auch einfacher zu synthetisierende Peptide von TAA in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien (SUN 1999, MARCHAND 1999 und 2003, SCHEIBENBOGEN 2000 (a) und 2003, WEBER 2003) werden zur Vakzinierung von Tumorpatienten eingesetzt. Insbesondere beim malignen Melanom sind eine Vielzahl von Antigenen, wie Tyrosinase, gp 100, MART-1/MelanA und weitere bekannt, die von ca. 90% der Melanomzellen exprimiert werden. Durch Modifikationen der ursprünglichen AS-Sequenz kann die MHC-Bindungsfähigkeit der Epitope verstärkt werden (PARKHURST 1996). Weiterhin werden DZ, die mit Tumorzell-Lysaten oder TAA-Peptiden beladen oder mit TAA-Epitopen kodierender mRNA transfiziert werden zur Vakzinierung eingesetzt (HU 1993, NESTLE 1998, SUN 1999, FONG 2001, BANCHEREAU 2001), auch der Einsatz fusionierter Zellen aus DZ und Tumorzellen werden gegenwärtig erforscht (PARKHURST 2003). In ersten klinischen Studien bei Patienten mit metastasiertem Melanom gelang es, TAA-reaktive CD8⁺-Lymphozyten durch die Impfung zu induzieren. Auch Tumorremissionen und eine Verlängerung der rezidivfreien Intervalle wurden bei einem kleinen Teil der Patienten beobachtet (MARCHAND 1999, ROSENBERG 1999, SCHEIBENBOGEN 2002 (b), ROMERO 2002).

Der Begriff der adoptiven Immuntherapie wurde bereits 1965 von Mathe geprägt. Er konnte zeigen, dass bei Patienten durch eine allogene Knochenmarktransplantation auch

immunkompetente Zellen übertragen werden, die neben einer „graft-versus-host“- auch eine „graft-versus-leukemia“-Reaktion vermitteln. Die Übertragung immunkompetenter Zellen, die in vivo Tumorzellen zerstören bezeichnete Mathe als adoptive Immuntherapie (MATHE 1965). In den achtziger Jahren wurden erste Versuche mit der Gabe von Lymphokinaktivierten-Killerzellen (LAK) und hochdosierter Gabe von IL-2 unternommen (ROSENBERG 1987). Diese scheiterten u.a. an der mangelnden Spezifität der LAK-Zellen. Daraufhin wurden Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) aus Melanomgewebe isoliert und den Patienten nach in vitro-Expansion reinfundiert (ROSENBERG 1986 und 1994, TOPALIAN 1987). Gegenwärtig wird in klinischen Studien die adoptive Immuntherapie mit Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten geprüft, nachdem diese ex vivo mit TAA um das 600-1200fache expandiert wurden (MITCHELL 2002, YEE 2002, MEIDENBAUER 2003, DUDLEY 2003).

1.6 Quantitative Nachweismethoden Antigen-reaktiver T-Zellen

Sowohl bei der Quantifizierung von Frequenzen natürlicher T-Zell-Immunität gegen Tumoren, als auch zum T-Zell-Monitoring von Immuntherapien sind Methoden erforderlich, die sensitiv genug sind, reaktive Lymphozyten mit einer Frequenz von $1/1 \times 10^4$ - $1/1 \times 10^5$ nachzuweisen. Darüber hinaus soll die T-Zell-Antwort gegen den Tumor direkt *ex vivo* ohne vorherige *in vitro*-Stimulation gemessen werden. Außerdem sollen die eingesetzten Methoden geeignet für die klinische Routine sein, um das Therapie-Monitoring zu standardisieren (KEILHOLZ 2002). Konventionelle Methoden, wie der $^{51}\text{Chromium}$ -Zytotoxizitäts-Test oder der Einsatz limitierter Verdünnungskulturen sind mit einem großen methodischen und zeitlichen Aufwand verbunden und erlauben aufgrund der geringeren Sensitivität den Nachweis antigenreaktiver Zellen nur nach vorheriger *in-vitro*-Expansion durch Stimulation mit dem entsprechenden Antigen und IL-2 (BRUNNER 1968, TASWELL 1981, ROMERO 1998). Diese Methode geht mit der Inkaufnahme quantitativer, funktioneller und phänotypischer Veränderungen der T-Lymphozyten einher.

In den vergangenen Jahren wurden der Enzymelinked immunospot-Assay (ELISPOT-Assay), der Zytokinnachweis per Durchflußzytometrie, sowie Tetramer-Analysen zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen auf Einzelzellniveau etabliert, die die direkte *ex vivo*-Darstellung von

Antigen-reaktiven Lymphozyten mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen von bis zu $1/1 \times 10^5$ erlauben. Diese Methoden werden entsprechend einer Übersichtsarbeit von Keilholz und Weber zum Monitoring von Immuntherapien empfohlen (KEILHOLZ 2002).

Der ELISPOT-Assay wurde 1988 zum Nachweis Zytokin-sezernierender Zellen entwickelt, nachdem er ursprünglich der Detektion antikörperproduzierender Zellen dienen sollte (CZERKINSKY 1983 und 1988). Die Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus, die den Nachweis der Antigen-reaktiven T-Zellen ohne vorherige in vitro-Expansion in einer Konzentration von $1/1 \times 10^5$ Zytokin-sezernierenden Zellen erlaubt (SCHMITTEL 1997, SCHEIBENBOGEN 1997 (a)). In mehreren Studien zeigen die Ergebnisse des ELISPOT Assays, eine enge Korrelation mit den Werten des CRA, bzw. dem LDA (MIYARIA 1995, LALVANI 1998, SCHEIBENBOGEN 1997 (a) und 2000 (b)). Weiterhin besitzt der Test eine hohe Reproduzierbarkeit (SCHMITTEL 1997), die inzwischen auch in Multizenterstudien belegt werden konnte (SCHEIBENBOGEN 2000). Der Nachweis der Zytokinsekretion ermöglicht die Aussage, dass es sich um funktionell aktive (im Gegensatz zu areaktiven oder anergen) T-Zellen handelt (LALVANI 1997). Die Beurteilung des Phänotyps der Zelle gelingt jedoch nur indirekt und mit großem methodischem Aufwand.

Der ELISPOT-Assay, der bereits zur Analyse von Immuntherapien weit verbreitet ist (ASAI 2000, ARLEN 2000), funktioniert nach folgendem Prinzip (siehe auch Abb. 1.1): Die von Antigen-reaktiven T-Zellen sezernierten Zytokine werden zunächst durch Bindung an einen Antikörper auf einer Membran gebunden. Dann werden die Zytokine durch einen zweiten Antikörper markiert, der durch eine Farbstoffreaktion sichtbar gemacht wird. Die sezernierten Zytokine konzentrieren sich in einem Hof um die reaktiven Lymphozyten, so dass nach deren Abwaschen die Anzahl, Lage und Größe der Punkte den ursprünglichen Positionen Zytokin-sezernierender und somit einem „Fingerabdruck“ der antigenreaktiven Zellen entsprechen (ÖSTERBORG 1995, HERR 1996, SCHEIBENBOGEN 1997). Inzwischen sind ELISPOT-Protokolle für den Nachweis unterschiedlicher Zytokine entwickelt worden: $\text{INF}\gamma$ (CZERKINSKY 1988), $\text{TNF}\alpha$ (HERR 1996), $\text{TNF}\beta$ (SCHMID 1997), IL-1 (NORDSTROM 1992), IL-2, IL-4 (EL GHAZALI 1993), IL-5 (MEDAHT 1998), IL-6 und IL-10 (MERVILLE 1993), sowie Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-Stimulierender Faktor (GM-CSF) und Granzym B (RINISLAND 2000).

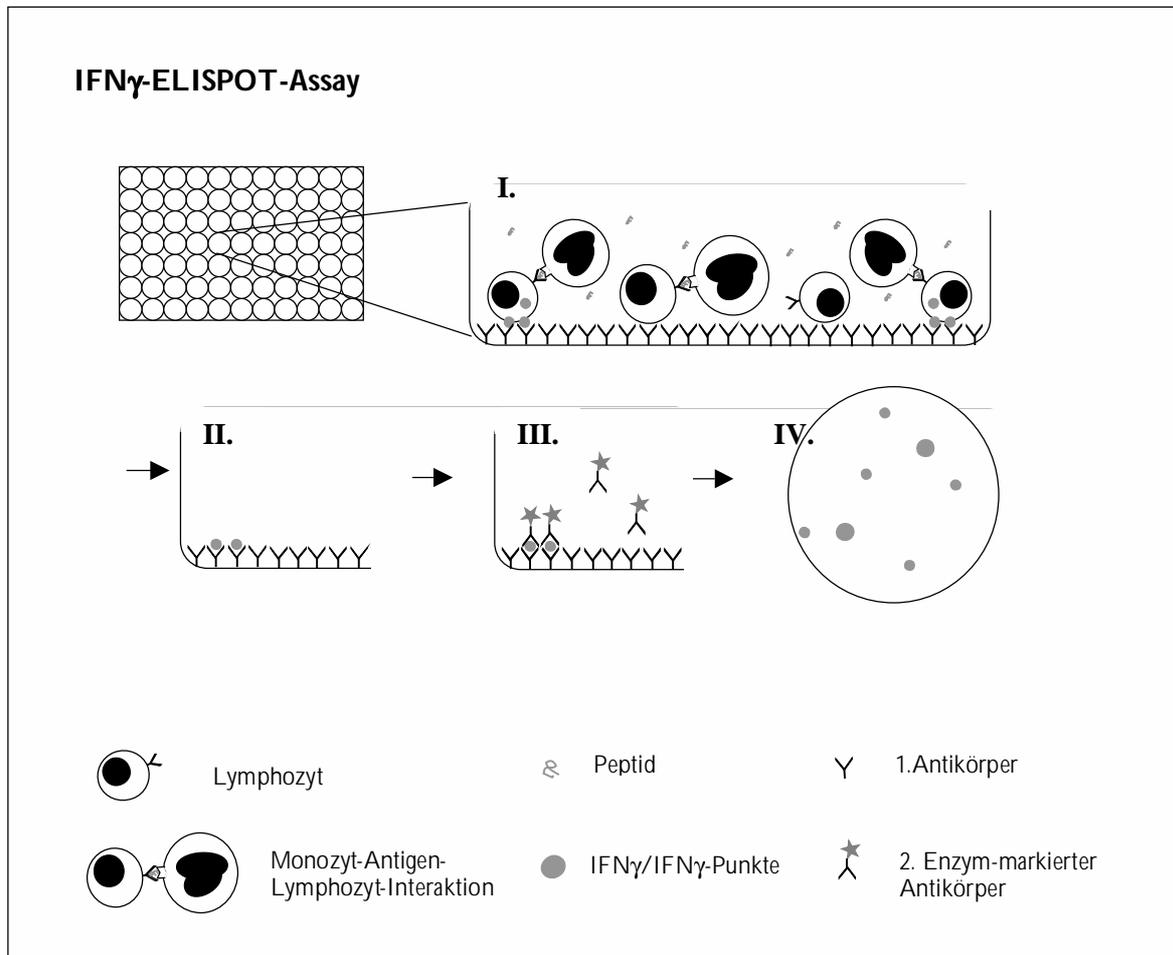


Abbildung 1.1 IFN γ -ELISPOT-Assay I. In einer 96-well-Nitrozellulose-beschichteten Platte, die mit einem 1. anti-IFN γ -Antikörper beschichtet ist, werden MNZ mit einem Peptid koinkubiert. II. Das sezernierte IFN γ wird an 1. Antikörper gebunden. III. Das an den ersten anti-IFN γ -Antikörper gebundene IFN γ mit einem zweitem anti-IFN γ -Antikörper markiert, an dessen Fc-Terminus ein Enzym gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Substrates wird eine Farbreaktion ausgelöst. IV. Nach Sichtbarwerden der Farbpunkte wird die Platte ausgewertet.

Die große Verfügbarkeit von Durchflußzytometern, das schnelle Erzielen von Ergebnissen innerhalb von 24 Stunden sowie die einfache technische Durchführbarkeit haben innerhalb weniger Jahre zu einer intensiven Entwicklung durchflußzytometrischer Methoden zur Analyse spezifischer T-Zellen geführt (MAINO 1998). Antigen-reaktive Lymphozyten werden funktionell durch Färbung intrazellulärer (IZ-DZ) (ANDERSSON 1988, JUNG 1993, PRUSSIN 1995) oder

sezernierter, oberflächengebundener Zytokine (SDZ) (BROSTERHUS 1999) nachgewiesen. Auch mit dieser Methode gelingt die direkte ex vivo-Detektion reaktiver Zellen ohne vorherige Expansion aus PBMZ-Präparationen oder aus Vollblut (SUNI 1998). Der Vorteil der Durchflußzytometrie gegenüber dem ELISPOT liegt in der Möglichkeit, simultan den Phänotyp, bzw. funktionelle Subtypen der reaktiven Zellen zu identifizieren (PRUSSIN 1997, KERN 1998). Das Prinzip der IZ-DZ beruht auf dem Nachweis Antigen-spezifischer Zytokinfreisetzung, wobei das Zytokin nach Zugabe eines Sekretionshemmers, wie Brefeldin A oder Monensin intrazellulär akkumuliert. Nach Färbung extrazellulärer Epitope mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern erfolgt eine Fixierung mit nachfolgender Permeabilisierung der Zellen, die die intrazelluläre Färbung der fraglichen Zytokine mit fluoreszierenden Antikörpern ermöglicht. Die **Abbildung 1.2 A** gibt einen Überblick über das Prinzip der intrazellulären Zytokinfärbung.

Die extrazelluläre Färbung sezernierter Zytokine (SDZ) macht Gebrauch von einem bispezifischen Antikörper, der durch Bindung an membranständige Epitope auf der Zelle fixiert wird. Der zweite Bindungsterminus ist spezifisch für ein Zytokin, das nach einer mehrstündigen Stimulationsphase sezerniert und von dem bispezifischen Antikörper gebunden wird, wie **Abbildung 1.2 B** schematisch darstellt. Zusätzlich können ebenfalls zelluläre Epitope zur Identifizierung der Lymphozytensubpopulation gefärbt werden. Der SDZ birgt gegenüber dem IZ-DZ die Möglichkeit die gefärbten und lebenden Lymphozyten zu separieren und weiter zu analysieren oder sie zu expandieren (MANZ 1995).

Die Antigen-Spezifität von T-Zellen lässt sich durch direkte Färbung des TZR mittels Tetrameren nachweisen. Tetramere oder auch Multimere sind Komplexe aus einem MHG Komplex samt β 2-Mikroglobulin, dem fraglichen Antigen und einem fluoreszierenden Farbstoffmolekül (ALTMANN 1996). Durch den Einsatz von Tetrameren zum Nachweis antigen-spezifischer T-Zellen ist es auch möglich, funktionell anerge T-Zellen darzustellen (LEE 1999) und sie durch simultane Färbung extrazellulärer Epitope einem Subtyp zuzuordnen (OGG 1998, CALLAN 1998). Andererseits erlaubt der Nachweis Tetramer-positiver Zellen alleine keine Aussage über deren funktionelles Potential (OELKE 2002). Es besteht aber die Möglichkeit, die detektierten Zellen zu separieren und weitergehenden auch funktionellen Untersuchungen zuzuführen (DUNBAR 1998, ROMERO 1998, YEE 1999, VALMORI 1999 und 2002).

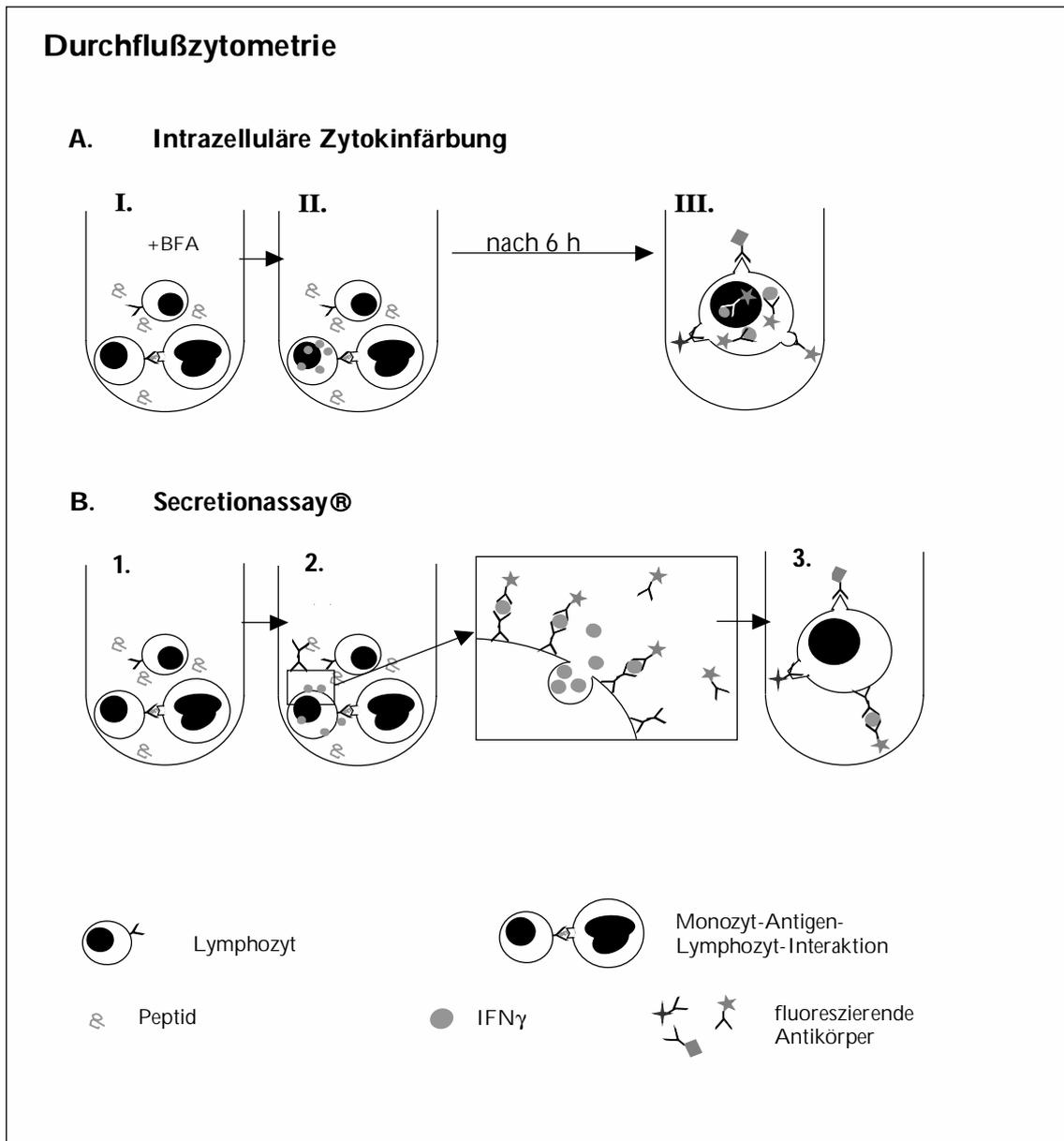


Abbildung. 1.2 Funktionsprinzipien durchflußzytometrischer Methoden zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen

A IZ-DZ: Peptid-Inkubation der MNZ unter Sekretionsinhibition durch BFA (I.). Dadurch werden die Antigen-spezifisch produzierten Zytokine intrazellulär gespeichert (II.). Nach 6 Stunden erfolgt die Färbung extrazellulärer Epitope und der intrazellulär gespeicherten Zytokine mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern (III.).

B S-DZ: Nach der Inkubationsperiode (1.) mit einem Peptid folgt die Sekretionsphase, während der sezernierte Zytokine an einen extrazellulär gebundenen bispezifischen Antikörper binden (2.). Anschließend werden die extrazellulär gebundenen Zytokine und extrazellulärer Epitope mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt (3.).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die im peripheren Blut von Melanompatienten nachweisbaren Melanom-reaktiven T-Zellen direkt ex vivo zu quantifizieren und phänotypisch zu charakterisieren.

Im einzelnen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Die Etablierung einer Methode zur T-Zell-Quantifizierung auf Einzelzellniveau mit der Möglichkeit der simultanen Phänotypisierung.
2. Die Charakterisierung der T-Zell-Antwort gegen autologe Melanomzellen.
3. Charakterisierung der T-Zell-Antwort gegen ein neues T-Zell-Epitop der Tyrosinase.

1.8 Durchführung der Arbeit

1. Die Evaluierung zweier durchflußzytometrischer Methoden, der intrazellulären Zytokindetektion (IZ-DZ) und des IFN γ -Secretionassay® (S-DZ), erfolgte durch den Vergleich mit dem IFN γ -ELISPOT-Assay: die Frequenzen Influenza-Matrix-Protein (IMP 58-66)-reaktiver T Zellen gesunder Spender wurden mit allen Methoden jeweils dreimal gemessen und bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit und ihrer Übereinstimmung mit den Daten des IFN γ -ELISPOT-Assays verglichen.
2. Die Frequenzen der Melanom-reaktiven CD8+-Zellen, bzw. CD4+ Lymphozyten wurden nach Kurzzeitinkubation mit den autologen Melanomzellen direkt ex vivo bestimmt. Die Charakterisierung nach Differenzierungstypen (d. h. naive, Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen) erfolgte durch Bestimmung der CD45RA und CCR7-Expression. Durch Nachweis des Apoptose-induzierenden Mediators Granzym B sollte das zytotoxische Potential der Melanom-reaktiven T-Zellen beurteilt werden. In Einzelfällen

wurde auch die Reaktivität gegenüber Epitopen einzelner TAA, wie Tyrosinase, gp 100 oder MelanA/MART-1 analysiert. Bei zwei Patienten wurde außerdem die T-Zell-Antwort gegen die Melanomzellen im Verlauf einiger Monate untersucht.

3. Die T-Zell-Antwort gegen ein von unserer Arbeitsgruppe neu identifiziertes HLA-A1-restringiertes Epitop der Tyrosinase sollte mittels IZ-DZ näher charakterisiert werden. Neben der Zuordnung der reaktiven MNZ zur CD3+CD8+-Subpopulation sollte die Expression des zytotoxischen Mediators Granzym B untersucht werden.