

4 DISKUSSION

4.1 Methodenetablierung

In dieser Arbeit wurden zirkulierende T-Zellen von Patienten mit metastasiertem Melanom analysiert, die spezifisch autologe Tumorzellen erkennen. Neben der Quantifizierung der Reaktivität direkt ex vivo sollten der Phänotyp und funktionelle Parameter der gegen die Tumorzellen gerichteten T-Lymphozyten charakterisiert werden. In einer vorhergehenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im peripheren Blut von Melanompatienten CD8+ T-Lymphozyten nachweisbar sind, die auf allogene HLA-Klasse-I-gematchte Melanomzellen reagieren (LETSCHE 2001). Die in der Arbeit mittels ELISPOT-Assay quantifizierten PBMZ zeigten Melanomreaktive T-Zellen Frequenzen von $1/10^5$ - $1/10^4$ CD8+ Zellen. Der ELISPOT-Assay erlaubt lediglich die Quantifizierung reaktiver Zellen, eine weitere Beurteilung des Phänotyps ist nur indirekt und mit großem methodischen Aufwand möglich. Bei zwei Patienten gelang es durch aufwendige Separation der Lymphozyten und Blockierungs-Experimente die reaktiven Lymphozyten der CD8+ Subpopulation zuzuordnen.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten diese Untersuchungen jetzt insofern weitergeführt werden, Phänotyp und Effektorfunktionen der tumorreaktiven T-Zellen direkt zu charakterisieren. Dazu war zunächst die Etablierung einer geeigneten Methode notwendig, die erlaubt, die Reaktivität einer T Zelle durch Nachweis der Antigen-induzierten Zytokinproduktion und gleichzeitig deren Phänotyp zu bestimmen. Die IZ-DZ und die S-DZ, die diese Option bieten, wurden bezüglich ihrer Eignung zur T-Zell-Quantifizierung im Vergleich mit dem ELISPOT validiert. Die in der Einleitung beschriebenen HLA-I-Antigen-Tetramere eignen sich nicht für die formulierte Fragestellung, da nur Zellen mit einer einzigen, bekannten Antigen-Spezifität dargestellt werden können (ALTMANN 1996). Das gesamte Antigen-Repertoire der autologen Tumorzellen, welches sicherlich auch etliche individuelle TAA einschließt, ist aber unbekannt.

Die Methodvalidierung erfolgte durch jeweils dreimalige Durchführung der IZ-DZ, des ELISPOT-Assays und der S-DZ, indem die Reaktivität von PBMZ gesunder Spender gegenüber dem IMP 58-66 gemessen wurde. Nachfolgend wurden die mit der jeweiligen Methode erzielten Ergebnisse verglichen. Die dreimalig durchgeführte Quantifizierung der Influenza-reaktiven CD8+ T-Zellen mit der IZ-DZ zeigte gut reproduzierbare Ergebnisse. Die Frequenzen der Viruspeptid-reaktiven Zellen in der IZ-DZ korrelierten eng mit den Frequenzen, die mittels ELISPOT-Assay gemessen wurden (ASEMISSEN 2001). Die Übereinstimmung der mit den beiden Methoden ermittelten Ergebnissen lässt auch den Schluss zu, dass sämtliches produziertes IFN γ (detektiert mit IZ-DZ) auch sezerniert wird (gemessen mit dem ELISPOT-Assay).

Die hier gezeigte Korrelation zwischen IZ-DZ und ELISPOT-Assay steht in Einklang mit den Veröffentlichungen anderer Autoren: Eine gerade erschienene Arbeit verglich die Quantifizierung von HIV-reaktiven T-Zellen aus dem peripheren Blut HIV-seropositiver Probanden mit dem ELISPOT-Assay, dem IZ-DZ und durch Tetramere: Es zeigte sich ebenfalls eine Übereinstimmung der Daten von ELISPOT und IZ-DZ, wohingegen sich mit Tetramerfärbungen fünffach höhere Frequenzen viruspezifischer Zellen fanden (SUN 2003). In einer weiteren Studie wurde der hohe Hintergrund IFN γ + Zellen im S-DZ durch simultane Färbung mit Tetrameren umgangen. Die Frequenzen der IFN γ -Tetramer-doppelt-positiven Zellen nach Virus- bzw. MelanA-Peptid-Stimulation korrelierten mit den im ELISPOT-Assay bzw. in der IZ-DZ ermittelten. Die Ergebnisse der zitierten Arbeit zeigen außerdem eine zunehmende Messgenauigkeit der S-DZ bei abnehmender Hintergrundfärbung je höher die zu erwartenden T-Zell-Frequenzen sind (PITTET 2001). Diese Daten konnten in einer Arbeit von Whiteside, in der ELISPOT-Assay, IZ-DZ und Tetramerfärbungen parallel zum Monitoring einer Vakzinierungsstudie bei Melanompatienten eingesetzt wurden, nur eingeschränkt bestätigt werden. Vor und nach der Vakzinierung wurde bei allen Patienten die Anzahl reaktiver bzw. Peptid-spezifischer T Zellen mit den drei Methoden bestimmt. Mit dem ELISPOT-Assay wurden insgesamt geringere Frequenzen Peptid-spezifischer Zellen gemessen im Vergleich zu den durchflußzytometrischen Methoden, mit deren Ergebnissen zudem keine Korrelation bestand. Die Analyse der Ergebnisse der durchflußzytometrischen Methoden ergab bei den gp 100- bzw. MART-1/MelanA-reaktiven T-Zellen zwar eine Korrelation, jedoch keine Übereinstimmung, da die Anzahl der Tetramer-bindenden Zellen, wie auch in der oben erwähnten Arbeit von Sun höher als die der Zytokin-produzierenden war (WHITESIDE 2003).

Die Quantifizierung der Virus-reaktiven T-Zellen mit S-DZ ergab keine reproduzierbaren Frequenzen IFN γ -sezernierender CD8 $^+$ T-Zellen. Dementsprechend korrelierte die gemessene Anzahl der reaktiven Lymphozyten im S-DZ auch nicht mit den im ELISPOT-Assay ermittelten Frequenzen Influenza-reaktiver Zellen. Bei der Darstellung der S-DZ-Messung als CD8-IFN γ -Diagramm (Abb. 3.4) fiel insbesondere auf, dass sich die IFN γ -PE-gefärbten Zellen nicht als abgrenzbare Population präsentieren, sondern in einer bandartigen Konfiguration in den als positiv definierten Bereich der Fluoreszenzintensität hinüberreichen. Weiterführende Experimente zeigten starke unspezifische Bindungsaffinität des anti-IFN γ -PE-mAK. Eine Färbung von membranständigem IFN γ konnte durch Kontrollen mit dem im IZ-DZ verwendeten anti-IFN γ -FITC-mAK ausgeschlossen werden (ASSENMACHER 1996, SCHEFFOLD 2000). Die verglichen mit dem ELISPOT-Assay höheren T-Zell-Frequenzen in der stimulierten Probe entstehen möglicherweise infolge einer IFN γ -Bindung auf Nachbarzellen Zytokin-sezernierender Lymphozyten durch die dort gebundene Fang-Matrix, den bispezifischen anti-IFN γ -mAK. In der Literatur, d.h. vom Hersteller wird die S-DZ mit einer guten Reproduzierbarkeit und einer Nachweisgrenze mit $1/10^5$ CD8 $^+$ T-Zellen beschrieben (BROSTERHUS 1999). Frühere Versionen des S-DZ sollten durch den Einsatz von Gelatine als Trennmatrix zwischen den Lymphozyten die Bindung von IFN γ an benachbarten, nicht selbst Zytokin-sezernierende Zellen verhindern (MANZ 1995), die aber nicht im aktuell zur Verfügung stehenden Versuchssatz enthalten ist. Die oben bereits erläuterte Arbeit von Pittet steht im Widerspruch zu diesen Daten und kann eine gute Qualität der Quantifizierung Antigen-reaktiver PBMZ im Vergleich mit anderen Methoden auf Einzel-Zell-Niveau zeigen. Auftretende unspezifische Färbung, die mitunter mehr als 90% ausmacht, kann durch Ausschluss toter Zellen behoben werden (PITTET 2001). Eine Bereinigung der Daten durch Ausgrenzen toter Zellen konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend eignet sich der IZ-DZ als Methode für die Quantifizierung der T-Zellen mit vergleichbarer Qualität wie der IFN γ ELISPOT. Darüber hinaus birgt der IZ-DZ die Möglichkeit zur simultanen Analyse des Phänotyps mit maximal drei Parametern bei einem Laser oder bei zwei Lasern bis zu maximal vier Parametern, bzw. an speziellen Durchflußzytometern mit mehr als zwei Lasern auch mit einer größeren Anzahl (LEE 1999). Eine abschließende

Beurteilung der S-DZ kann hier wegen der hohen unspezifischen Bindung des anti-IFN γ -PE-mAK nicht erfolgen. Prinzipiell bietet diese Methode neben der Quantifizierung und der simultanen Phänotypenbestimmung die Möglichkeit der Separierung der nicht fixierten, lebenden IFN γ + Lymphozyten (ASSENMACHER 1998, BROSTERHUS 1999). Dies ermöglicht die weiterführende Analyse der reaktiven Zellen, z.B. der Untersuchung ihrer lytischen Aktivität oder Expandierbarkeit oder ihrer Separation für therapeutische Zwecke im Rahmen der adoptiven Immuntherapie (OELKE 2000, BECKER 2001).

4.2 Analyse Tumor-reaktiver T Zellen bei Melanompatienten

Nach Kurzzeitinkubation mit den autologen Melanomzellen für sechs Stunden erfolgte die Analyse zirkulierender T-Zellen des peripheren Blutes mittels Vier-Farben-IZ-DZ. In Bestätigung der vorhergehenden Studie wurden bei 5 von 6 Patienten im CD8+ Kompartiment und bei 2 von 6 Patienten unter den CD4+ T Zellen eine Reaktivität gegen die autologen Tumorzellen im peripheren Blut nachgewiesen. Mit Frequenzen zwischen 0,06% und 2,17% liegt die Anzahl der reaktiven Lymphozyten in einer Größenordnung, die mit der virusgerichteter Immun-Antworten vergleichbar ist (LALVANI 1998, SCHEIBENBOGEN 1997, GAMADIA 2001) und demonstriert eine starke Antigenität des Melanoms. Von den zwei Patienten, die eine CD4+IFN γ + Population zeigten, exprimierte nur eine der beiden Melanomzelllinien MHC-II-Komplexe. Von anderen Autoren wurden MHC-I-restringierte CD4+ Zellen mit zytotoxischen Funktionen gegenüber den autologen Tumorzellen beschrieben (KHARKEVITCH 1994, DARROW 1996, JACOB 1997, NISHIMURA 1999). In dieser Arbeit wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen zur Klärung dieses Phänomens durchgeführt.

Eine zentrale und bislang nicht beantwortete Frage war, ob die zirkulierenden tumor-reaktiven CD8+ T-Zellen fähig sind, direkt Melanomzellen *in vivo* zu zerstören. Hinweise auf diese Frage geben die phänotypischen Charakteristika der hier detektierten Zellen. Unter Berücksichtigung der IFN γ -Produktion, der Expression von CD45RA, eine die Signalvermittlung über den TZR verstärkende Tyrosinphosphatase und CCR7, einem Lymphknoten-Homing-Rezeptor können vier Untergruppen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften definiert werden: Naive T-Zellen (CD45RA+CCR7+IFN γ -), abhängig von der CCR7-Expression zentrale (CCR7+) oder Effektor-(CCR7-CD45RA-IFN γ +) Gedächtniszellen und Effektorzellen, die CD45RA+CCR7- sind und IFN γ + exprimieren (HAMANN 1997 und 1999, SALLUSTO 1999). Die hier detektierten, in Reaktion auf die Melanomzellen IFN γ +produzierenden Zellen sind überwiegend CD45RA+ und exprimieren, wie weiterführende Untersuchungen zeigten, kein CCR7. Diese Population differenzierter Effektorzellen ist fähig in entzündetes Gewebe zu migrieren, um dort Effektorfunktionen, einschließlich der Lyse von Zielzellen zu vermitteln. Unter den melanom-reaktiven T-Zellen finden sich auch CD45RA-CCR7+ oder CCR7- Gedächtnis T-Zellen. Das entspricht der Vorstellung verschiedener Autoren, dass es zu einer effektiven Tumormunität

spezifische Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen bedarf, die sowohl unmittelbare zytotoxische Funktionen vermitteln, als auch dauerhafte Gedächtnisleistung aufrechterhalten (KAECH 2002). Die Darstellung zytotoxischer Mediatoren, wie Granzym B und Perforin gibt über den Phänotyp hinaus Hinweise auf das zytotoxische Potential der Zellen (APPAY 2002 (b)). Die Koexpression von Granzym B in dem überwiegenden Teil der tumorreaktiven Zellen demonstriert deren zytotoxisches Potential. Auch Tyrosinase-reaktive T-Zellen, die nach Vakzinierungstherapie bei Melanompatienten nachweisbar waren, zeigten einen CD3+CD8+GranzymB+ Phänotyp (SCHEIBENBOGEN 2002 (b)). Auch bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom konnten in fortgeschrittenem Stadium CEA-reaktive T-Zellen identifiziert werden, die mit der Expression von CD3+CD8+CD45RA+ der Effektorpopulation zuzuordnen waren (NAGORSEN 2000). Bei hämatologischen Erkrankungen, wie der AML, konnten WT1-reaktive Lymphozyten mit Effektorphänotyp nachgewiesen werden (SCHEIBENBOGEN 2002 (c)).

In einer weiterführenden Untersuchung, die in Kooperation mit Danila Valmori am Ludwig-Institut in Lausanne durchgeführt wurde, wurde das zytotoxische Potential dieser Zellen weiter untersucht. Dabei kam uns die Tatsache entgegen, dass bei einem Patienten (Pat. 2) ein Teil der reaktiven Lymphozyten gegen Tyrosinase gerichtet war und deshalb mittels Tyrosinase-Tetrameren isoliert werden konnte. Die durch FACS-Sorting isolierte Population zeigte einen einheitlichen CD45RA+CCR7-Effektorphänotyp. Nachfolgend wurden die Tyrosinase-spezifischen T Zellen zur funktionellen Analyse direkt *ex vivo* im Zytotoxizitäts-Assay eingesetzt. Die Lyse Tyrosinase-positiver Zielzellen demonstrierte das zytotoxische Potential und somit vollständige funktionelle Aktivität der Tyrosinase-spezifischen Effektorzellen (VALMORI 2002). Im Gegensatz zu diesen *ex vivo* funktionell aktiven T Zellen stehen die Ergebnisse einer anderen Arbeit, in der ebenfalls Tyrosinase-spezifische Zellen bei einem Patienten mit metastasiertem Melanom nachgewiesen und isoliert werden konnten. Diese phänotypisch als Effektorzellen charakterisierten Zellen waren funktionell anerg und konnten weder Zytokine freisetzen noch Tyrosinase-positive Zielzellen lysieren (LEE 1999).

Bei Patient 2 konnte auch funktionell mittels IZ-DZ nach Kurzzeit-Inkubation mit Tyrosinase-Peptid nachgewiesen werden, dass etwa die Hälfte der Melanom-reaktiven Zellen gegen Tyrosinase gerichtet ist. Jeweils ein geringer Teil der Zellen war MelanA- und gp100-reaktiv. Bei

allen diesen Antigenen handelt es sich um nicht mutierte Melanozyten-Antigene. Diese Daten zeigen, dass sog. „Selbstantigene“ als immunogene TAA fungieren können und zur Expansion tumor-reaktiver T-Zellen führen können. Von einem Teil der Patienten mit Tyrosinase-reaktiven T-Zellen ist bekannt, dass Autoimmunphänomene, wie Vitiligo auftreten können (OGG 1998). Dass bei Patient 2 keine Symptome autoreaktiver Immunantworten beobachtet werden konnten, deutet auch darauf hin, dass mit dem Auftreten Tumor-Antigen-spezifischer T-Zellen nicht grundsätzlich ein Durchbrechen der immunologischen „Selbst-Toleranz“ verbunden ist. Aufgrund des begrenzten Zellmaterials konnten nicht bei allen Patienten weitergehende Untersuchungen zur Identifizierung einzelner TAA durchgeführt werden. In dieser Arbeit konnten bei allen der sechs untersuchten Patienten eine Reaktivität gegen die autologen Melanomzellen in mindestens einer Lymphozyten-Subpopulation nachgewiesen werden. Analysen anderer Autoren zeigen, dass gegen einzelne untersuchte Tumorantigene jeweils nur bei einem Teil der Patienten spezifische T-Zellen nachweisbar waren. So besitzen beispielsweise zwischen 10 und 75% der Melanopatienten gegen MelanA gerichtete T-Zellen (SCHEIBENBOGEN 1997 (b), PITTET 1999, 2002, DHODAPKAR 2000), NY-ESO-1 spezifische CD8+ Zellen lassen sich in 5–10% der Melanopatienten nachweisen (VALMORI 2000, JÄGER 2000) und 10-25% CAMEL-spezifische Zellen finden sich in unterschiedlichen Analysen (RIMOLDI 2000, GRIFFIOEN 2001). Trotz einer inzwischen großen und weiter zunehmenden Anzahl bekannter TAA sind sicher noch etliche Antigene unentdeckt. Es ist daher von großer Wichtigkeit an der Identifizierung weiterer Antigene zu arbeiten, um das gesamte Antigen-Repertoire des Melanoms aufzudecken. Die immunogensten Antigene werden Eingang in therapeutische Konzepte finden, wie bereits viele Antigene als Vakzinierungspeptide beim Malignem Melanom eingesetzt werden (SCHEIBENBOGEN 2003).

Von besonderem Interesse ist die Frage nach der biologischen Relevanz der bei allen untersuchten Patienten nachgewiesenen Melanom-reaktiven T Zellen. Der klinische Verlauf der Patienten bietet indirekte Hinweise auf die Frage nach der Effizienz der in vitro nachgewiesenen Tumor-Reaktivität: Zwei der sechs untersuchten Patienten mit metastasiertem Melanom sind nach Metastasenresektion über mehrere Jahre tumorfrei. Dies ist bei diesen beiden Patienten mit Stadium IV Melanom ein ungewöhnlicher Verlauf und möglicherweise Hinweis für eine immunologische Kontrolle des Tumors. Die anderen vier Patienten zeigen einen progredienten Krankheitsverlauf. Diese Befunde korrelieren mit Berichten von zahlreichen Patientenfällen aus

der Literatur. So berichtet Anchini von einem Patienten, in dessen Blut sich MelanA/Mart1-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten, dessen Melanom aber progredient war (ANICHINI 1999). Auch nach Vakzinierungstherapien, kann nur bei einem Teil der Patienten, bei denen eine T-Zell-Reaktivität induziert werden konnte, eine Remission beobachtet werden (NIELSEN 2000, SCHEIBENBOGEN 2003). Hinweise auf die Ursache fehlender Kontrolle ergeben sich aus der Analyse des Krankheitsverlaufs einzelner Patienten: Coulie stellt eine Patientin mit seit Jahrzehnten bekanntem Melanom vor, die nach unspezifischer Immuntherapie und Vakzinierung eine starke dauerhafte T-Zell-Antwort hat. Eine nach jahrelanger Remission aufgetretene Metastase zeigte einen Escape-Mechanismus durch kompletten Verlust sämtlicher HLA-Epitope (COULIE 1999). Entsprechend können auch bei unseren Patienten Escape-Mechanismen der progredienten Metastasen auf unterschiedlichen Ebenen der Zell-Differenzierung zugrunde liegen (s.a. Einleitung, Kapitel 1.1).

Nur bei einem der sechs untersuchten Patienten (Patient 2) konnten die ersten Analysen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose durchgeführt werden bevor der Patient eine Therapie erhalten hatte. Demzufolge muss die zu diesem Zeitpunkt nachweisbare Melanom-gerichtete Immunantwort spontan durch den Tumor induziert worden sein. Bemerkenswerterweise veränderte diese Population sich weder bezüglich der Frequenz noch des Phänotyp während des dreijährigen Beobachtungszeitraumes. In diese Zeit fielen diverse Therapien, wie Chemotherapie und Bestrahlung, aber auch Immuntherapien, wie eine systemische TNF α -Therapie und eine Vakzinierungstherapie mit MAGE-3-Peptid. Aber auch 15 Monate nach rezidivfreier Resektion einer einzelnen progredient wachsenden Metastase waren die tumor-reaktiven T-Zellen unverändert nachweisbar. Von viralen Infektionen ist bekannt, dass die kurz nach der Infektion auftretenden Effektorzellen bald nach Antigenelimination wieder verschwinden (BELL 1990). Der Nachweis einer so großen Population Antigen-reaktiver zirkulierender Effektorzellen spricht für die Persistenz des Antigens in Form minimaler residueller Tumorzellen. Möglicherweise unterscheidet sich auch die Kinetik der Immunantwort bei Tumorerkrankungen von der viraler Infektionen oder es erfolgt eine dauerhafte Restimulation infolge unterschiedlicher Mechanismen: Möglicherweise führen Mikrometastasen durch kontinuierliche Restimulation zur Persistenz Tumor-reaktiver Effektor-T-Zellen. Kreuzreaktivität mit Antigenen, die Analogien mit der Tyrosinase-Sequenz aufweisen, kann zu der lang andauernden Aufrechterhaltung der Melanom-reaktiven Population führen. Obwohl Tyrosinase z. T. in gesundem Gewebe wie den

Melanozyten der Haut exprimiert wird, ist es sehr unwahrscheinlich, dass dieser Antigen-Pool zur Aufrechterhaltung von mehr als 0,3% Antigen-reaktiver, teilweise auch GranzymB-exprimierender T-Zellen führt, insbesondere da keine Vitiligo oder andere Symptome von Autoimmunreaktionen aufgetreten sind, wie sie in der Literatur bei anderen Melanompatienten beschrieben worden sind (ROSENBERG 1997, OGG 1998, YEE 2000).

Da die anderen Patienten vor Analyse der Melanom-reaktiven T-Zell-Antwort bereits verschiedene Therapien erhalten hatten, kann nicht beurteilt werden, ob die T-Zell-Reaktivität spontan durch den Tumor oder die unterschiedliche Therapien, wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-2, Peptid-Vakzinierung oder auch durch Chemotherapie induziert wurde. Wie bei Patient 2 besaß ein großer Teil der reaktiven T-Zellen dieser Patienten mit der Expression von CD45RA und Negativität für CCR7 ebenfalls einen Effektor-Phänotyp. Ebenso konnte bei einem Teil der Melanom-reaktiven Zellen die Koexpression von Granzym B nachgewiesen werden. Die Übereinstimmungen bezüglich des Phänotyps Melanom-reaktiver Zellen bei unterschiedlichen Patienten legt die Vermutung nahe, dass auch bei diesen Patienten eine kontinuierliche Antigenstimulation der spezifischen T-Zellen erfolgt. Bisher ist noch unbekannt, zu welchen Zeitpunkten und in welchen Krankheitsstadien die Tumor-gerichtete Immun-Antwort auftritt.

4.3 Charakterisierung Tyrosinase-reaktiver Zellen bei Melanompatienten in Remission

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die IZ-DZ eingesetzt, um im ELISPOT-Assay nachgewiesene T-Zellen, die gegen ein neu identifiziertes Tyrosinase-Epitop gerichtet sind, weiter zu charakterisieren. Die Vorgehensweise zur Identifizierung des neuen Epitopes beruhte auf der Beobachtung, dass Melanompatienten, die nach IL-2 Therapie in Remission sind, melanom-reaktive T-Zellen als Träger der immunologisch vermittelten Melanom-Regression besitzen. Die HLA-A1-bindenden Kandidatenepitope wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI, die der Ermittlung möglicher Epitope dient, ausgewählt: Es handelt sich um Nona-, Deka- und Undekamere, die an Position 3 entweder Asparagin- oder Glutaminsäure tragen und an ihrem Carboxyterminus die Aminosäure Tyrosin aufweisen. Mit Hilfe dieses computergestützten Algorithmus wurden fünf Peptide der Tyrosinase ermittelt. Die MNZ von vier HLA-A1+ Patienten wurden mit fünf Kandidatenpeptiden der Tyrosinase direkt ex vivo inkubiert. Nach Kurzzeitinkubation der MNZ der Melanompatienten mit diesen Peptiden konnten mittels ELISPOT-Assay bei jedem der Patienten in Remission reaktive T-Zellen gegen mindestens eins der eingesetzten Tyrosinase-Peptide nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu besaßen die als Kontrolle untersuchten gesunden Spender oder Melanompatienten mit progredienter Tumorerkrankung keine Tyrosinase-gerichteten T-Zellen. In einer anderen Studie gelang in Analogie zu unseren Ergebnissen Molldrem bei CML-Patienten in Remission der Nachweis Proteinase3-spezifischer T-Zellen im Gegensatz zu Patienten mit progredienter Erkrankung (MOLLDREM 2000). Mittels ELISPOT-Assay konnte neben dem Nachweis von T-Zell-Antworten gegen die bereits bekannten HLA-A1-Epitope Tyr₁₄₆₋₁₅₆ und Tyr₂₄₃₋₂₅₁ (KAWAKAMI 1998, KITTLESEN 1998) ein neues Epitop der Tyrosinase identifiziert werden, das Dekapeptid DSDPDSFQDY an Position 454-463 des Tyrosinaseproteins (SCHEIBENBOGEN 2002). Von zwei gesunden Spendern konnte eine ZTL-Linie gezogen werden, die gegen das Tyrosinasepeptid Tyr₄₅₄₋₄₆₃ gerichtet war und mit Tyr₄₅₄₋₄₆₃ beladene Zielzellen, sowie Tyrosinase-exprimierende Melanomzellen lysieren konnten. Weitergehende durchflußzytometrische Phänotypanalysen der Lymphozyten eines Patienten mit hoher T-Zell-Frequenz ergaben, dass 80% der Tyrosinase-reaktiven Zellen Granzym B exprimierten. Der Nachweis reaktiver T-Zellen gegen das Tyrosinasepeptid₄₅₄₋₄₆₃ bei mehreren untersuchten

Patienten weist auf eine starke Immunogenität des Epiopes hin, ohne dass einer der Patienten Symptome einer Autoimmunerkrankung zeigte. Der Nachweis von Granzym B in den IFN γ -positiven Zellen deutet auch darauf hin, dass in den Zellen in der Peripherie keine Anergie induziert wurde. Diese Daten sprechen für die Eignung des neu identifizierten Epitops als immunogenes Vakzinepeptid in Therapien.

MNZ von Patienten in Remission als Screening-Instrument für die Identifikation von Epitopen zu nutzen, ist ein zeit- und kosteneffizientes Verfahren. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde auch von der Arbeitsgruppe Bystryn vorgestellt, indem MNZ von Melanompatienten nach Vakzinierungen mit polyvalenten Melanom-Impfstoffen im IFN γ -ELISPOT-Assay gegen ein Panel von Peptiden dieser Antigene analysiert wurden. Die HLA-Bindungsfähigkeit der einzelnen Peptide für bestimmte HLA-Typen wurde zuvor durch Affinitätstests gezeigt. Insgesamt konnten für 60% der analysierten Peptide eine Vakzine-induzierte T-Zell-Reaktivität nachgewiesen werden (REYNOLDS 2000). Auch für die Identifizierung viraler Epitope wurde eine effiziente Vorgehensweise von Kern entwickelt, der in der zitierten Arbeit eine bekannte antigene 15 Aminosäuren lange Sequenz des CMV-Proteins pp65 in sieben sich überlappende Nonamere zerlegte und mit diesem Peptidgemisch die MNZ CMV-seropositiver Gesunder inkubierte. Die Analyse der T-Zell-Antworten erfolgte mit der IZ-DZ und ermöglichte die Identifizierung zweier immunogener Nonapeptide des pp65 (KERN 1998). Die Effizienz dieser Ansätze zur Identifizierung neuer Epitope beruht zum einen mit dem Einsatz von ELISPOT-Assay und IZ-DZ auf Analysesystemen, die innerhalb kurzer Zeit von Stunden bis Tagen Quantifizierungen auf Einzelzellniveau ermöglichen, zum anderen erlauben diese Methoden die simultane Analyse einer großen Anzahl möglicher Kandidatenpeptide.

4.4 Schlussfolgerungen

Mit dem Nachweis Melanom-reaktiver T Zellen in der CD8+-Population bei fünf von sechs Melanompatienten und in der CD4+ Population bei zwei der sechs Patienten besaßen alle untersuchten Melanompatienten gegen die autologen Tumorzellen gerichtete T-Zellen. Nachfolgende Phänotypanalysen zeigten, dass es sich überwiegend um Effektorzellen handelte, die zytotoxisches Potential besaßen. Im Einzelfall konnte gezeigt werden, dass Tumorantigen-reaktive T Zellen direkt ex vivo Tumorzellen lysieren können. Diese Ergebnisse sprechen für eine aktive Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Melanom. Trotz ihres zytotoxischen Potentials vermitteln die Tumorreaktiven T-Zellen häufig keine ausreichende Tumorkontrolle in vivo, da in vielen Fällen trotz des Nachweises hochfrequenter Melanom-reaktiver Effektorzellen die Tumorerkrankung progredient ist. Neben zukünftiger Erforschung der Induzierbarkeit und der biologischen Bedeutung Tumor-reaktiver T-Zellen sind daher auch Untersuchungen der Tumor-Escape-Mechanismen für die Weiterentwicklung immunologischer Therapien notwendig.

Die Identifizierung neuer TAA ist für die Entwicklung Antigen-spezifischer T-Zell-Therapien wesentlich. Proteindatenbanken und computergestützte Algorithmen ermöglichen eine zeit- und kosteneffektive Suche nach neuen TAA-Epitopen. Mit dem Einsatz von Patienten-MNZ zum Screenen von HLA-A1-bindenden Kandidatenepitopen der Tyrosinase konnte ein neues Epitop als Zielstruktur zytotoxischer Effektorzellen identifiziert werden.

Mit der IZ-DZ steht eine Methode zur Verfügung, die neben der Quantifizierung der reaktiven Zellen auch die Möglichkeit der Phänotypcharakterisierung bietet. Sowohl bei der Erforschung der natürlichen T-Zell-Immunität gegen Tumoren als auch zum T-Zell-Monitoring von Immuntherapien ist die Beurteilung des Phänotyps reaktiver T-Zellen von großer Bedeutung.