

1 Einleitung

1.1 Immunantworten gegen Tumoren

Bereits Anfang des Jahrhunderts wurde von dem Pathologen HARDLEY die Hypothese einer möglichen Immunantwort gegen Tumoren durch den Nachweis von Leukozyteninfiltrationen bei einer Reihe von Tumoren bestätigt und sogar damit einhergehende Tumor-Regressionen z.B. beim Melanom beschrieben (Übersicht MANTOVANI 1992). Inzwischen existieren zahlreiche gute Hinweise, dass das Immunsystem tatsächlich zur Immunüberwachung in der Lage ist und Tumorzellen aufspüren und zerstören kann. So findet man bei immungeschwächten Individuen, z.B. Patienten mit HIV-Infektion oder unter immunsuppressiver Medikation ein erhöhtes Risiko maligne Erkrankungen zu entwickeln (LEVINE 1994). Nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie bilden sich solche Tumoren zum Teil wieder zurück (STARZL 1990). Zudem existieren zahlreiche Daten, in denen ein progressives Wachstum maligner Tumoren mit einer Suppression der endogenen Immunantwort einhergeht (Zusammenstellung bei ZEA 1995). Zu den dabei beobachteten Immun-Dysfunktionen gehört z.B. ein erniedrigtes Niveau von zytotoxischen T-Zellen (SEDELMAYR 1991), eine verminderte Natürliche-Killer (NK)-Zell-Aktivität (SARZOTTI 1997), verminderte Fähigkeit der Lymphokin-Produktion (FISCHER 1998), sowie verminderte Hypersensitivität vom verzögerten Typ (YOUNG). Neben diesen eher indirekten Hinweisen deuten vor allem Spontanremissionen, die z.B. beim Melanom (MACKENSEN 1994) und beim Nierenzellkarzinom (LUDWIG 1977) beschrieben sind, auf eine Immunüberwachung von Tumoren hin.

1.2 Immuntherapie von Tumoren

Immunologische Therapieansätze stellen vor allem wegen der Möglichkeit eines selektiven Angriffs auf die Tumorzellen, unter Verschonung der normalen Zellen, ein attraktives Konzept dar. Die Idee Tumoren durch eine Stimulation des Immunsystems zu bekämpfen ist aber nicht neu. Erste, wenn auch zumeist erfolglose Versuche, sich das Immunsystem bei der

Bekämpfung von Tumoren zu Nutzen zu machen, gab es bereits Ende des 19. Jahrhunderts (Zusammenstellung bei CURRIE 1972).

Neue Erkenntnisse in der Tumorimmunologie ermöglichen heute die Entwicklung erfolgreicherer Therapiestrategien: Als erstes ist die adoptive Immuntherapie zu nennen, deren Begriff bereits 1965 von MATHE geprägt wurde. Er konnte zeigen, dass bei Patienten durch eine allogene Knochenmarktransplantation immunkompetente Zellen übertragen werden können, die neben einer „Graft-versus-host“ auch eine „Graft-versus-leukemia“ Reaktion vermitteln. Die Weiterentwicklung dieses Konzeptes beinhaltet heute den adoptiven Transfer von „in vitro“ aktivierten zytotoxischen Killerzellen (LAK-Zellen) oder tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), welche z.T. zusätzlich mit Immunstimulantien wie z.B. IL-2 kombiniert werden (SUN 1999(a+b)). Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der „ex vivo“ Aktivierung der Effektorzellen, wodurch eine bei Tumorpatienten häufig vorhandene Immunsuppression umgangen werden kann.

Daneben existieren unspezifische Ansätze mit Immunstimulantien wie BCG oder mittels systemischer Zytokintherapie, bei der physiologisch vorkommende Zytokine wie IL-2, IFN α , IFN γ bereits mit klinischem Erfolg, (AULITZKY 1989, KEILHOLZ 1997+2000(a), LEGHA 1986, WHITTINGTON 1993) sowie IL-4, IL-12 oder M-CSF (ATKINS 1996, LOTZE 1994, REDMANN 1992) mit bislang keiner oder nur geringer Wirksamkeit, als Therapeutika eingesetzt werden. Im Rahmen einer lokalen Extremitäten-Perfusion kommt auch TNF- α in hohen Konzentrationen zum Einsatz (LIENARD 1992).

Eine weitere Therapiestrategie stellt die aktive spezifische Immuntherapie mittels Vakzinierung dar, die darauf abzielt, eine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren. Zunächst wurden Tumorzellen bzw. Zelllysate als Vakzine eingesetzt (SUN 1999(b), VERMORKEN 1999). Die Charakterisierung Tumor assoziierter Antigene (TAA) seit Anfang der 90er Jahre war die Voraussetzung für die Entwicklung von definierten Antigenvakzinen unter Verwendung von Peptiden bzw. Proteinen. Da Peptide relativ einfach für den klinischen Einsatz herzustellen sind, werden zur Zeit v.a. Peptid-Vakzine im Rahmen von Phase-I bis Phase-III-Studien getestet (SUN 1999(a+b)). Zudem kommen Anti-Idiotyp-

Ak als Vakzine zum Einsatz, welche bestimmte Tumor-assoziierte Antigene imitieren und somit eine spezifische anti-Tumor-Immunität auslösen sollen. Als weitere spezifische Therapiestrategie stehen Antikörper gegen bekannte Oberflächenstrukturen auf Tumorzellen zur Verfügung, wie z.B. Rituximab® bei Lymphomen, ein Antikörper, der gegen das B-Zell-Antigen CD20 gerichtet ist, oder Herceptin® gegen Her-2-neu bei Patienten mit Mamma-Karzinom.

1.3 Nachweis tumorreaktiver T-Zellen

Bei zahlreichen Tumorentitäten konnten Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) aus dem Tumorgewebe isoliert und „in vitro“ unter Zugabe von IL-2 expandiert werden (YANELLI 1996). Ein Grossteil dieser vornehmlich CD3+/CD8+ T-Zellen besitzt „in vitro“ lytische Fähigkeiten gegenüber autologen und zum Teil auch gegenüber allogenen, in bestimmten HLA-Allelen übereinstimmenden Tumorzellen. Diese Tumorzelllyse konnte durch MHC-Klasse-I-Antikörper ebenso wie durch Antikörper gegen T-Zell-Rezeptoren (TCR) blockiert werden, was für eine über MHC-Klasse-I vermittelte spezifische Erkennung der Tumorzellen spricht (HOM 1991, TOPALIAN 1989). Neben ihrer zytotoxischen Funktion sind TILs in der Lage, nach Tumorerkennung eine Reihe von Zytokinen wie GM-CSF, IFN γ und TNF α freizusetzen (HOM 1993). Darüber hinaus gelang der Nachweis spezifischer T-Zellen für TAA in einigen Tumor-infiltrierten Lymphknoten sowie im peripheren Blut von Melanompatienten (KAWAKAMI 2000, MAZZOCCHI 1994, PARMIANI 1990, WÖLFEL 1992).

1.4 Aktivierung und Effektorfunktionen von T-Zellen

Innerhalb der letzten Dekaden wurden intensiv die Aktivierungswege von CD8+ zytotoxischen T-Zellen erforscht: Der T-Zell-Rezeptor (TCR) spielt dabei eine zentrale Rolle und bindet spezifisch an bestimmte MHC-Klasse-I-Molekül/Antigen-Komplexe. Intrazelluläre Proteine, wie z.B. Tumorantigene werden zunächst in 8-10 Aminosäuren lange

Peptidfragmente in Proteasomen zerschnitten, danach werden sie von spezialisierten Transportmolekülen (TAP) in das endoplasmatische Retikulum befördert und verbinden sich dort mit für sie spezifischen MHC-Molekülen. Diese gelangen anschließend zur Zelloberfläche und präsentieren die Peptide in einer Art Tasche (OHNMACHT 2000). Daneben existieren Hinweise auf einen exogenen Weg, bei dem auch Antigene die nicht ins Zytoplasma gelangen von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (ALBERT 1998). Zusätzlich sind für die Aktivierung von T-Zellen sogenannte kostimulatorische Signale wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) notwendig, die an CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen binden. Sie befinden sich insbesondere auf Antigen präsentierenden Zellen (APCs) und z.T. auch auf Tumorzellen. Zudem sind bestimmte Zytokine (z.B. IL-2, IL-7, IL-12) für die Aktivierung von T-Zellen notwendig. Fehlen diese sekundären Signale, ist die alleinige Antigen-Erkennung für eine T-Zell-Aktivierung meist nicht ausreichend, und es kann zu Toleranz oder Anergie der T-Zelle und fehlender Proliferation und Effektorfunktion kommen (DUNNION 1999).

Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen führt zu klonaler Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen zu aktivierten Effektor-T-Zellen. Diese vermitteln ihre Zytotoxizität über Exozytose von intrazellulär gespeicherten Substanzen wie Perforin und Granzyme-B oder über die direkte Bindung von Fas-Liganden (FasL) an entsprechende Fas-Rezeptoren (FasR) an der Oberfläche von Tumorzellen. Daneben existieren Lyse-Mechanismen von Tumorzellen, die über TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) vermittelt werden (THOMAS 1998). In allen Fällen kommt es zur Apoptose, zum programmierten Zelltod der Tumorzelle (Übersicht bei GRAUBERT 1996). Zahlreiche Studien zeigten, dass die Freisetzung von IFN γ durch CD8⁺ Tc1-Effektorzellen einen essentiellen Bestandteil bei der immunologischen Zerstörung von Tumoren und der Generierung von Gedächtnis-Zellen darstellt. Dabei kann es durch eine direkte Zerstörung von Tumorzellen oder eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung von immunkompetenten Zellen zum Auslösen einer Antitumor-Antwort kommen. Bei der Elimination von Tumorzellen sind zudem direkte und indirekte nicht-immunologische Wege, wie z.B. die Hemmung der Angiogenese über IFN γ -induzierte Angiogenese-Inhibitions-Faktoren wie IP-10 (IFN-inducible protein-10) und Mig (monokine induced by IFN-gamma) bekannt (Zusammenstellung bei DOBRZANSKI 2000). Darüber hinaus stimuliert IFN γ die

Antigen-Prozessierung und Hochregulation von HLA-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen. Ebenso ist ein über $\text{IFN}\gamma$ -vermittelter Wachstumsstopp in der G_1 -Phase des Zellzyklus von Tumorzellen beschrieben (FARRAR 1999).

Nach der T-Zell-Aktivierung gehen die meisten der aktivierten CD8^+ T-Zellen zu Grunde, dies bezeichnet man als Activation-induced-cell-death (AICD). Zu einem kleinen Teil differenzieren aktivierte CD8^+ T-Zellen in Memory-T-Zellen. Unklar ist, ob diese Gedächtnis-T-Zellen aus differenzierten CD8^+ Effektor-T-Zellen oder aus naiven T-Zellen entstehen (DOBRZANSKI 2000).

Bei der Aktivierung von CD8^+ T-Zellen spielen CD4^+ T-Zellen in vielen Modellen eine wichtige Rolle. Entsprechend dem „licensing-Modell“ (MATZINGER 1989) liefern CD4^+ T-Helfer-Zellen durch die Antigen-Erkennung auf APCs ein Signal, welches die APCs aktiviert und ihnen eine direkte Stimulation von T-Killer-Zellen ermöglicht. Auf molekularer Ebene zeigt sich für diesen Prozess vor allem eine $\text{CD40L}/\text{CD40}$ Interaktion zwischen Dendritischen Zellen, die als APCs fungieren, und T-Helfer-Zellen verantwortlich (LANZAVECCHIA 1998(b)). T-Helfer-Zellen erkennen 10-15 AS lange Peptidfragmente, die über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden. Inzwischen gelang es einige MHC-Klasse-II-restringierte Peptidepitope von Tumorantigenen (Tyrosinase, gp100, Mage-3, TPI, LDHP, CDC27) zu charakterisieren (WANG 1999). Sogar zytolytische Eigenschaften konnten bei CD4^+ T-Zellen der Th1-Subpopulation nachgewiesen werden (HAHN 1995, HU 1993, LEVITSKY 1994, OVERWIJK 1999+2000+2001, SOMASUNDARAM 2000). Der genaue Beitrag von CD4^+ T-Zellen im Vergleich zu anderen Effektorzellen ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Die folgende Abbildung verdeutlicht das Zusammenspiel von CD8+T-Zellen, CD4+T-Zellen, sowie von professionellen APCs bei der Zerstörung von Tumorzellen:

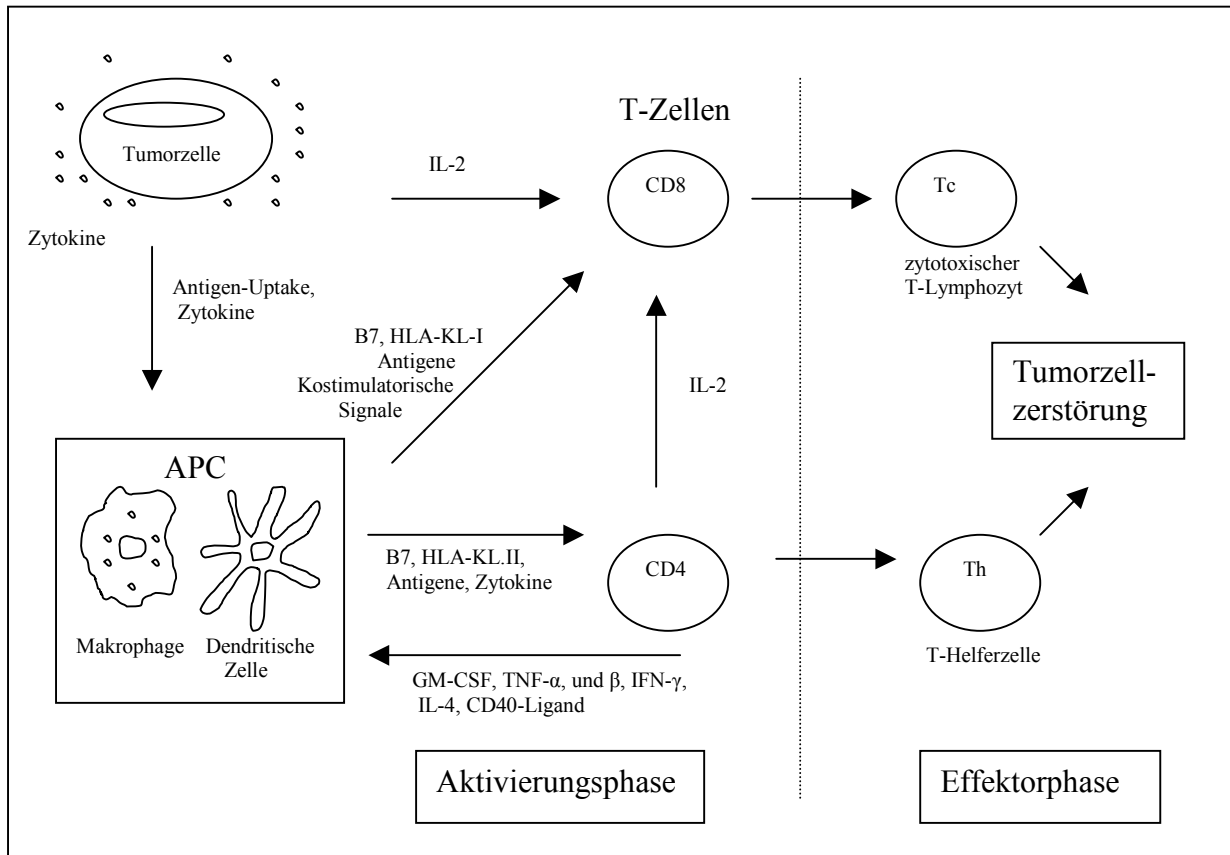


Abbildung 1.1: Immunantwort gegen Tumorzellen

(nach Sun Y, Paschen A und Schadendorf D: Cell based vaccination against melanoma-background, preliminary results, and perspective, J Mol Med. 1999;77:593-608)

Daneben spielen als weitere T-Zell-Subpopulation möglicherweise auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bei der Tumorvernichtung eine Rolle (GRAUBERT 1996). Das Verhalten der NK-Zellen wird von verschiedenen Rezeptoren reguliert, welche die Effektorfunktion in Form von direkter Zytotoxizität oder Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen aktivieren oder hemmen. Eine wichtige inhibitorische Rolle spielt dabei der Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche-Rezeptor (KIR-Rezeptor). Dieser Rezeptor interagiert hauptsächlich mit klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen auf Zielzellen und verhindert dadurch eine NK-Zell-Aktivierung. Zellen, denen HLA-Klasse-I-Moleküle fehlen oder die

diese vermindert exprimieren, werden zu Zielstrukturen für eine über NK-Zellen vermittelte Destruktion (BROOKS 2000, LANIER 1998, VALES-GOMEZ 2000).

1.5 Tumorantigene

Heute weiß man, dass es sich bei den meisten Tumorantigenen nicht um tumorspezifische Strukturen handelt. Der Prozess der malignen Transformation kann mit der Expression von Proteinen einhergehen, die in normalen Zellen gar nicht oder in viel geringeren Konzentrationen vorhanden sind und daher beim Immunsystem nicht zu immunologischer Toleranz führen. Diese TAAs werden in den meisten Fällen über MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II-Moleküle als Peptide auf der Oberfläche von Tumorzellen expremiert und stellen Zielstrukturen für zytotoxische-T-Zell-(CTL)-Reaktionen dar (OHNMACHT 2000). Die Identifizierung der ersten TAAs gelang 1992 der Arbeitsgruppe um BOON mit Hilfe von CTL-Klonen und mittels cDNA-transfizierten COS-Zellen (BOON 1992(a+b)). Inzwischen wird die Antigencharakterisierung durch neue Methoden kontinuierlich vorangetrieben. Dazu zählen die Weiterentwicklung von cDNA- Expressionssystemen durch den Einsatz von Retroviren und autologen Fibroblasten (WANG 1999), die SEREX-Technik (=serological screening of cDNA expression library) (KAWAKAMI 2000), sowie biochemische Ansätze mittels Peptid-Elution und anschließender Massenspektrometrie (BOON 1997). Vor allem die als „Reverse Immunology“ bezeichnete Technik brachte neue TAAs hervor: Ausgehend von einer bekannten Protein-Sequenz werden Kandidaten-Peptid-Sequenzen für einen bestimmten HLA-Typ synthetisiert. Peptide, die erfolgreich an HLA-Moleküle binden, werden von APCs präsentiert auf die Induktion einer zytolytischen Reaktion bei CTLs getestet (BOON 1996). Diese Strategie wird auch bei der Herstellung einer cDNA library mittels RDA (representative difference analysis) angewandt (ARNOUDSE 1999, LUCAS 2000).

Die ersten TAAs wurden beim Melanom, nachfolgend aber auch für zahlreiche andere Tumorentitäten identifiziert. Aufgrund der genetischen Instabilität von neoplastischen Zellen ist eine große Heterogenität bei der Expression von HLA-Molekülen und TAAs möglich (OHNMACHT 2000). Man unterscheidet inzwischen fünf große Gruppen von Tumorantigenen:

Die erste beinhaltet die sogenannten Aktivierungs-Antigene. Diese werden von Genen codiert, die in den meisten normalen Geweben des Erwachsenen ruhen. Eine Ausnahme bilden die MHC-Klasse-I-negativen Zellen des Testis (BOON 1996+1997). Zu dieser Gruppe gehören die Cancer/Testis-Antigene MAGE, BAGE, GAGE, RAGE und als neu identifiziertes das NY-ESO-1. Einige Autoren zählen außerdem die Muzine zu dieser Gruppe, die man vor allem als Oberflächenproteine auf Mamma-, Ovarial- und Pankreas-Karzinomen findet (COULIE 1999). Auf normalen Zellen sind Muzine stark glykolisiert und werden deshalb nicht von T-Zellen erkannt. Bemerkenswert ist, dass bei Muzinen die T-Zell Erkennung auf Tumorzellen ohne HLA-Restriktion stattfindet (BOON 1997).

Eine zweite Gruppe bilden die gewebespezifischen Differenzierungs-Antigene, die z.B. beim Melanom von Genen wie Tyrosinase, Melan-A/Mart-1, gp100/Pmel17, gp75/TRP-1 und TRP-2 codiert und auf Melanomen und in normalen Melanozyten expremiert werden (VAN DEN EYNDE 1997). Außerdem zählen Antigene wie CEA z.B. bei kolorektalen Tumoren oder PSA beim Prostata-Ca zu dieser Gruppe.

Daneben existiert eine dritte Gruppe von Antigenen, die ausschließlich in Tumorzellen überexpremiert werden, hier sind Her-2/neu, p53 oder PRAME als Beispiele zu nennen.

Die vierte Gruppe bilden die viralen Antigene, zu denen als bekanntestes HPV 16 bei Zervix-Karzinomen zählt.

Viele Tumor-spezifische Antigene entstehen durch Punktmutationen oder Deletionen ubiquitär expremierter Gene. Sie stellen die fünfte Gruppe dar und sind im Gegensatz zu den vorher genannten in der Regel Individuen-spezifisch. Allerdings hat man gleiche Mutationen innerhalb einiger Antigene dieser Gruppe bereits bei verschiedenen Individuen gefunden, wie z.B. CDK4, MUM-1, β -Catenin, CASP-8, RC-24-C, bcr-abl (Übersicht BOON 1996) oder KIAA 0205 (GUEGUEN 1998).

Tabelle 1.1:

Die fünf Hauptgruppen humaner Tumor-Antigene

Aktivierungs-Ag	Differenzierungs-Ag	Überexpressions-Ag	Virale Ag	Mutations-Ag
MAGE-1	Tyrosinase	Her2/neu	HPV	CDK4
MAGE-3	MelanA/MART-1	PRAME	EBV	MUM-1
MAGE-6	gp100/Pmel17	P53		β -Catenin
BAGE	gp75/TRP-1			CASP-8
GAGE-1,2	TRP-2			RC-24-C
GAGE 3-6				bcr-abl
RAGE	CEA			KIAA 0205
NY-ESO-1	PSA			
	AFP			
Muzine				

(nach Coulie et al.: Antitumor Immunity at work in a Melanoma Patient. Adv Cancer Res. 1999;76:213-42)

1.6 Nachweismethoden

Der Nachweis Tumor-spezifischer Immunantworten gestaltete sich bislang schwierig. Besonders der Versuch mittels „in vitro“-Analysen exakt den „in vivo“-Aktivierungsstatus zu reflektieren, stellt eine besondere Herausforderung dar. Zytotoxische tumorreaktive T-Zellklone, die entweder aus Tumorgewebe oder peripherem Blut gewonnen wurden, liegen teilweise in Frequenzen von weniger als $1/10^5$ Lymphozyten vor, so dass sehr sensitive Nachweismethoden benötigt werden. Für den klassischen Zytotoxizitäts-Assay, den Chromium-release-Assay ist zunächst eine „in vitro“-Stimulation durch Zugabe von IL-2 und wiederholte Restimulation mit Antigenen oder Tumorzellen notwendig. Hieraus resultieren möglicherweise qualitative und quantitative Veränderungen der Vorläufer-Zellen dieser T-Zell-Klone. In den letzten Jahren wurden sensitivere Meßmethoden entwickelt, mit denen der direkte „ex vivo“-Nachweis antigenspezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut möglich

ist. Damit gelingt erstmals die direkte Quantifizierung und weitergehende Charakterisierung der T-Zell-Antwort gegen Tumoren. Darüber hinaus können Aussagen über den Funktionszustand und über das zytotoxische Potential solcher tumorreaktiven T-Zellen „in vivo“ getroffen werden.

Eine dieser Testmethoden stellt der Enzyme-linked-Immunospot (ELISPOT)-Assay dar, mit dessen Hilfe sich spezifische T-Zellen über die Antigen-induzierte Sekretion von Zytokinen mit hoher Sensitivität auf Einzelzellniveau nachweisen lassen (CZERKINSKY 1988). Die Eignung dieses Assays zur Analyse der T-Zell-Antwort direkt aus dem peripheren Blut konnte inzwischen von verschiedenen Gruppen bestätigt werden. In Multicenter-Studien zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit beim Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen mittels des IFN- γ -ELISPOT-Assays (PASS 1998, SCHEIBENBOGEN 1997(a+b) und 2000(b), SCHMITTEL 1997, 2000 und 2001). Zudem besteht eine enge Korrelation zwischen der im ELISPOT-Assay ermittelten Anzahl IFN γ -freisetzender T-Zellen auf einen Antigenreiz hin und dem Grad an Zytotoxizität, die mit dem Chromium Release Assay gemessen wurde (DI FABIO 1995, MIYAHIRA 1995, SCHEIBENBOGEN 1997 (a+b) und 2000 (b)).

Darüber hinaus gelingt seit kurzem der direkte Nachweis von spezifischen T-Zellen über die Messung der Antigen-induzierten Zytokinexpression auch intrazellulär mit Hilfe der Durchflusszytometrie (ASEMISSEN 2001, BROSTERHUS 1999, KERN 1998, SUNI 1998). Diese ermöglicht im Gegensatz zum ELISPOT-Assay die weitergehende Charakterisierung von Tumorantigen-reaktiven T-Zellen über Oberflächenantigene, ohne eine aufwendige Separation. Auch mit real-time-PCR können verschiedene Zytokine und Aktivierungsmarker mit sehr hoher Sensitivität gleichzeitig aus einer Probe bestimmt werden – allerdings ohne Analysemöglichkeit auf Einzelzellniveau. Der durchflusszytometrische Nachweis spezifischer T-Zellen mit fluoreszierenden MHC-Peptid-Komplexen, sogenannten Tetrameren, ergänzt die Palette dieser T-Zell-Assays. Bei dieser Methode können auch funktionell inaktive, als anerg bezeichnete T-Zellen erfasst werden. Die aufwendige Herstellung der Tetramere gelingt allerdings bisher nur für wenige HLA-Allele (Zusammenstellung ROMERO 1998).

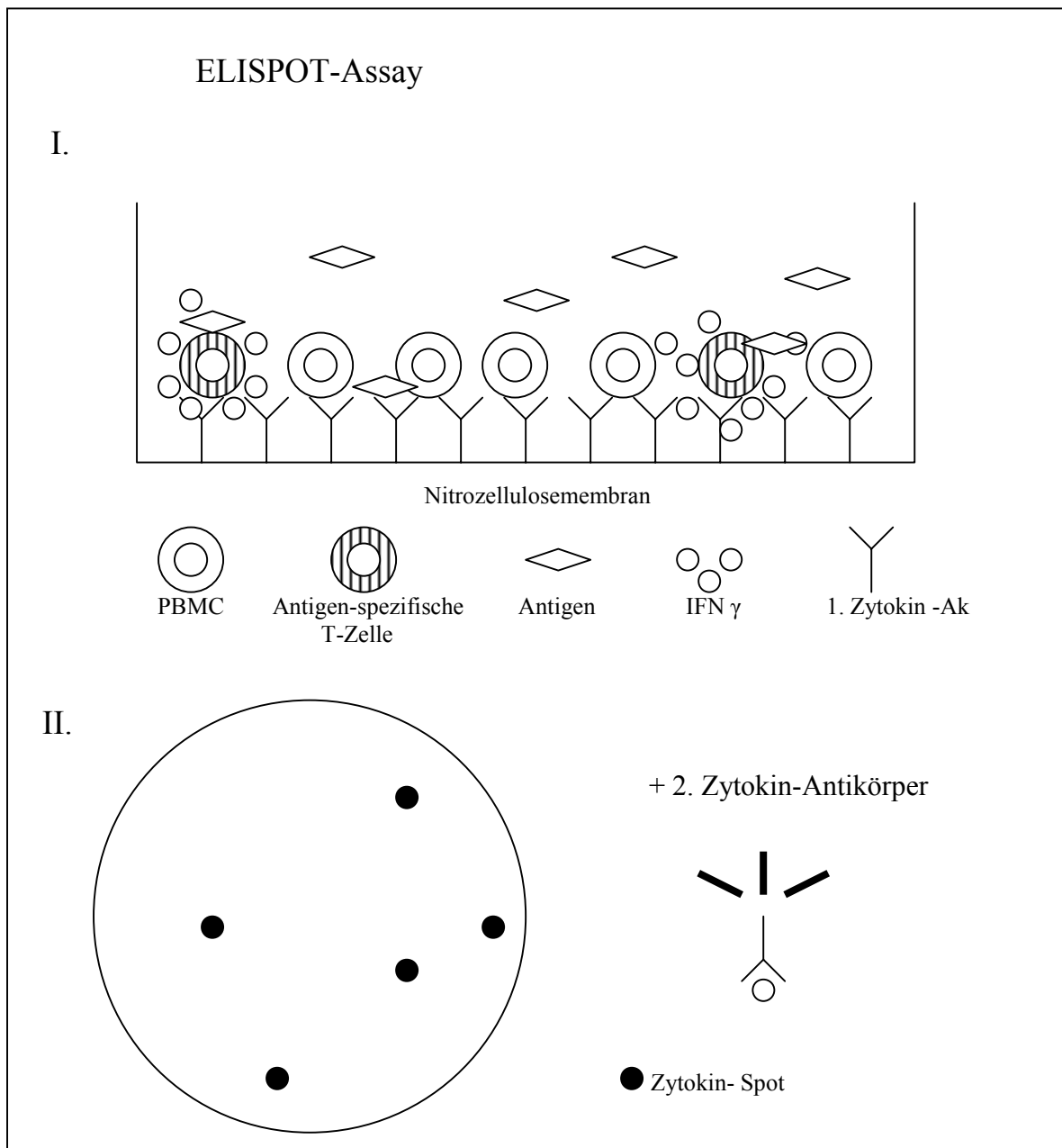


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des ELISPOT-Assays

Basisschritte des ELISPOT-Assays: a) Coaten der 96-well-Platten mit Zytokin-spezifischem Ak, b) Blockierung der Platte zur Minderung der unspezifischen Bindung, c) Inkubation von PBMCs oder T-Zellsubpopulationen mit dem entsprechenden Ag oder Zellen, d) Zellyse mit Detergenz-Lösung, e) Zugabe des gelabelten sekundären Ak, f) Nachweis der Ak-Zytokin-Komplexe

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, wie häufig und in welchen Frequenzen zirkulierende Tumor-reaktive T-Zellen direkt aus unstimulierten Lymphozyten des peripheren Blutes von Melanompatienten nachzuweisen sind. Als Testmethode wurde der bereits für die Analyse von Peptid-spezifischen T-Zellen etablierte IFN γ -ELISPOT-Assay gewählt, mit dem Antigen-spezifische T-Zellen aufgrund ihrer Antigen-induzierten IFN γ -Freisetzung nachgewiesen werden. Der entscheidende Vorteil dieses Assays liegt in seiner hohen Sensitivität, die eine direkte ex vivo Quantifizierung von Antigen-reaktiven T-Zellen erlaubt. Darüber hinaus lässt die IFN γ -Sekretion von T-Zellen nach Tumorzellerkennung den Schluß zu, dass es sich um funktionell aktive (im Gegensatz zu areaktiven oder anergen) T-Zellen handelt.

Um die T-Zell-Antworten gegenüber einem breiten Spektrum von möglichen Melanom-Antigenen zu testen, sollten im Gegensatz zu vielen bisherigen Studien, die nur einzelne isolierte Antigene in Form von Peptiden oder Proteinen einsetzten, hier HLA-A2 oder HLA-A1-identen allogene Melanom-Zelllinien als Zielstrukturen im ELISPOT-Assay verwendet werden. Zunächst stand daher die Etablierung eines neuen IFN γ -ELISPOT-Assays mit Tumorzelllinien als Zielstrukturen einer peripheren T-Zellantwort im Mittelpunkt. Die Durchführbarkeit eines solchen Ansatzes wurde bereits in zwei früheren Studien gezeigt, in denen die meisten HLA-A2⁺ Melanom-spezifischen T-Zell-Klone und T-Zelllinien allgemeine Antigene erkannten, die auf der Mehrzahl von Melanomzelllinien vorhanden sind (ANICHINI 1996, HOM 1993).

Da bei dem hier gewählten Ansatz eine mögliche Alloreaktivität gegen fremde HLA-Allele, sowie das Vorliegen von Tumor-reaktiven T-Zellen bei Gesunden nicht auszuschließen war, diente die Analyse bei gesunden HLA-A1⁺ und HLA-A2⁺ Personen als Kontrolle. Anschließend sollte die Analyse von Tumor-reaktiven T-Zellen bei Melanompatienten erfolgen.

Zusätzlich sollten bei einigen Patienten nähere phänotypische und funktionelle Analysen zur Charakterisierung der Melanom-reaktiven T-Zellen dienen. Bei Patienten, bei denen

autologes Tumormaterial zur Verfügung stand, wurde darüber hinaus der Vergleich des allogenen Testsystems mit autologen Tumorzelllinien angestrebt. Die ermittelten Daten sollten anschließend im Hinblick auf Korrelationen zu dem klinischen Verlauf der Melanompatienten geprüft werden.