

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines modifizierten ELISPOT-Assays zum „ex-vivo“ Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen

Für den direkten „ex-vivo“ Nachweis von spezifischen T-Zellen stehen inzwischen verschiedene Assays zur Verfügung. Eine Möglichkeit des Nachweises bietet die Antigen-induzierte Zytokin-Freisetzung. Dabei können die sezernierten Zytokine wie z.B. IFN- $\gamma$  extrazellulär mit dem ELISPOT-Assay nachgewiesen werden. Der Zytokin-Nachweis gelingt jedoch auch intrazellulär mittels durchflusszytometrischen Analysen oder mit Hilfe der quantitativen PCR. Darüber hinaus kann man spezifische T-Zellen mit Hilfe von fluoreszierenden MHC-Peptid-Komplexen, den Tetrameren nachweisen, die spezifisch an T-Zell-Rezeptoren binden. Bei der Auswahl der Assays spielen die Sensitivität und exakte Quantifizierbarkeit der T-Zell-Antworten sowie die Möglichkeit der funktionellen Charakterisierung dieser T-Zell-Antworten eine wichtige Rolle (Zusammenstellung bei CLAY 2001).

Der inzwischen sehr gut etablierte IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay weist von den oben genannten Assays die höchste Sensitivität auf und ermöglicht den Nachweis von spezifischen T-Zellen bis zu minimalen Frequenzen von  $1/10^5$  Lymphozyten. (ASAI 2000, CLAY 2001, SCHEIBENBOGEN 1997 (a+b) + 2000(b), SCHMITTEL 1997 + 2000). Im Gegensatz zu den Assays, die Antigen-spezifische T-Zellen über Zytokinfreisetzung nachweisen, kann der Nachweis spezifischer T-Zellen mittels Tetrameren lediglich gegen Peptid-Antigene erfolgen. Zudem erlaubt diese Nachweismethode keine Aussage über den funktionellen Zustand der T-Zellen und die Herstellung der Tetramere gestaltet sich relativ aufwendig und gelingt bislang nur für wenige HLA-Allele, so dass sie für unsere Fragestellung nicht geeignet war.

Auch im ELISPOT-Assay wurden als Antigene bislang meist nur Peptide oder Proteine eingesetzt. Neu bei der hier durchgeführten Untersuchung ist der Einsatz von Tumorzellen als Zielstrukturen einer T-Zell-Antwort im ELISPOT-Assay. Dieser Ansatz bietet die

Analysemöglichkeit eines breiten Antigenpektrums, einschließlich bisher nicht definierter Antigene.

Die Verwendung von allogenen, in bestimmten HLA-Merkmalen übereinstimmenden Melanomzelllinien als Zielstrukturen im ELISPOT-Assay ermöglichte die Analyse der T-Zell-Antwort auch von Patienten, bei denen kein autologes Tumormaterial zur Verfügung stand. Der Einsatz von allogenen Tumorzelllinien birgt aber das Problem einer möglicherweise auftretenden „Alloreaktivität“ gegen fremde HLA-Allele. Es fanden sich bei Gesunden jedoch nur sehr niederfrequente T-Zellantworten gegen die allogenen Melanomzelllinien. Dies korreliert mit Ergebnissen aus gemischten Lymphozyten-Kulturen im ELISPOT-Assay, die kaum Alloreaktivität zeigten (SCHMITTEL 1997). Möglicherweise ist die fehlende Alloreaktivität auf die kurze Inkubationszeit der T-Zellen mit den Tumorzellen im „ex-vivo“-ELISPOT-Assay oder auf das Fehlen von Zytokinzusätzen, insbesondere IL-2, zurückzuführen, so dass keine wesentliche Alloreaktivität auftritt oder induziert wird.

Ein Nachteil des ELISPOT-Assays mit PBMCs besteht in der fehlenden Möglichkeit der weitergehenden Charakterisierung von Subpopulationen der Antigen-spezifischen T-Zellen, wie sie z.B. mit mehrfarbigen Durchflusszytometrie-Analysen gelingt. Dieser Nachteil kann durch eine vorherige Separation der eingesetzten Lymphozyten in Subpopulationen gelöst werden.

#### **4.2 Tumor-reaktive T-Zellen bei Melanompatienten**

Bei 11 von 19 Melanompatienten, die in dieser Arbeit analysiert wurden, konnten zwischen 0,8% und 0,04% spezifische IFN $\gamma$ -sezernierende T-Zellen gegen Ziel-Strukturen auf HLA-A1- bzw. HLA-A2-positiven Melanomzelllinien im peripheren Blut nachgewiesen werden. Diese starken T-Zell-Antworten liegen in ähnlichen Frequenz-Bereichen wie Virus-spezifische T-Zellen (GAMADIA 2001, TAN 1999) und zeigen, dass Tumoren immunogen sein können. Wie vom methodischen Ansatz zu erwarten war und bei zwei HLA-A2+ Patienten gezeigt werden konnte, handelte es sich bei der T-Zellantwort gegen allogene

Tumorzelllinien vor allem um eine MHC-Klasse-I -vermittelte CD8+ T-Zell-Antwort. Die Relevanz der Analyse mit allogenen Tumorzelllinien für die Beurteilung einer T-Zell-Antwort gegen autologe Tumoren wurde durch die Untersuchungen bei fünf Patienten belegt, bei denen zusätzlich autologe Tumorzellen zur Verfügung standen. Bei drei von diesen fünf Patienten konnten gegen autologe Tumorzellen ähnliche Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen wie gegen allogene HLA-A1- oder HLA-A2-positive Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Ein Patient zeigte allerdings lediglich eine T-Zellantwort gegen seinen autologen Tumor und nicht gegen die allogenen Tumorzelllinien. Diese Tatsache ist, wie auch in anderen Studien beschrieben (BAURAIN 2000, KARANIKAS 2001), möglicherweise als Ausdruck der Erkennung eines privaten Antigenes zu werten, welches nur auf dem autologen Tumor vorhanden ist. Im Gegensatz dazu konnte bei einem weiteren Patienten eine starke T-Zellantwort gegen die allogenen Tumorzelllinien gemessen werden, nicht jedoch gegen den autologen Tumor. Möglicherweise haben die autologen Tumorzellen in diesem Fall das/die notwendige(n) Ziel-Antigen(e) verloren und können somit durch die tumorreaktiven T-Zellen nicht mehr erkannt werden.

Natürliche Tumor-gerichtete T-Zellantworten direkt ex vivo konnten auch in wenigen anderen Studien nachgewiesen werden, bislang allerdings nur gegen isolierte TAA u.a. Tyrosinase, Melan-A/MART-1 und das neu charakterisierte NY-ESO-1 beim Melanom (ASAI 2000, DREXLER 1999, D'SOUZA 1998, HERR 1994, JÄGER 2000(a+b), LEE 1999(a+b), PALERMO 2001, PITTET 1999, REYNOLDS 1997, SCHEIBENBOGEN 1997(a) + 2000(b), VALMORI 2000(a)). Darüber hinaus zeigten sich natürliche T-Zellantworten auch bei anderen Tumorentitäten, z.B. gegen EpCam, her-2/neu und CEA beim Kolon-Karzinom (NAGORSEN 2000) oder gegen ein tumor-spezifisches Mutationsantigen bei einem Bronchial-Karzinom-Patienten (KARANIKAS 2001).

### **4.3 Phänotyp und Funktionsstatus Tumor-reaktiver T-Zellen**

Eine wichtige und bisher nicht ausreichend beantwortete Frage ist, in wieweit die im ELISPOT über IFN- $\gamma$ -Sekretion nachgewiesenen Tumor-reaktiven T-Zellen auch Tumoren „in vivo“ zerstören können. Im Rahmen dieser Studie konnten indirekte, auf funktionellen

und phänotypischen Analysen beruhende Hinweise gesammelt werden, dass es sich bei den nachgewiesenen T-Zellen tatsächlich um „in-vivo“ zytotoxische Effektor-Zellen handeln könnte. Zunächst wurden die Tumor-reaktiven T-Zellen durch ihre Fähigkeit der direkten IFN $\gamma$ -Freisetzung nach Kontakt mit Melanomzelllinien charakterisiert, welche als eine Eigenschaft von Gedächtnis- (CD8+/CD45RO+/IFN $\gamma$ +) und Effektor- (CD8+/CD45RA+/IFN $\gamma$ +) T-Zellen im Unterschied zu naiven T-Zellen (CD8+/CD45RA/IFN $\gamma$ -) gezeigt werden konnte (HAMANN 1997). Durch phänotypische Analysen Melanom-reaktiver T-Zellen bei einem Patienten konnten IFN $\gamma$ -freisetzende T-Zellen sowohl in CD8+/CD45RA+ als auch in CD8+/CD45RO+ Subpopulationen nachgewiesen werden. Für CD8+/CD45RA+/IFN $\gamma$ -freisetzenden T-Zellen wurde die Fähigkeit der direkten Freisetzung der Apoptose-induzierenden Serinproteasen Granzyme-B und Perforin, sowie zytotoxische Effektorfunktionen ohne weitere „in vitro“-Stimulation gezeigt (HAMANN 1997). Die direkte Freisetzung von Granzyme-B nach Tumorzell-Erkennung konnte mittels eines Granzyme-B-ELISPOT-Assays bei einem Patienten nachgewiesen werden. Die Frequenzen der Granzyme-B freisetzenden T-Zellen erreichten allerdings nur 1/10 der IFN $\gamma$ -freisetzenden T-Zellen. Das könnte sowohl auf eine geringere Sensitivität des Granzyme-B-ELISPOT-Assays oder auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass nicht alle IFN $\gamma$ -freisetzenden T-Zellen auch Granzyme-B sezernieren.

Bezüglich der biologischen Funktion sind in anderen Studien sowohl CD8+Effektor-T-Zellen, die nach Tumorantigen-Kontakt direkt IFN- $\gamma$  freisetzen, als auch anerge T-Zellen beschrieben (HERR 1996, KARANIKAS 2001, LEE 1999 (a+b), SCHEIBENBOGEN 1997(a) + 2000 (b)). In der Studie von LEE et al. wurden mittels Tetrameren zirkulierende MART-1- und Tyrosinase-spezifische T-Zellen nachgewiesen, welche nicht in der Lage waren als Antwort auf ein spezifisches Peptid IFN $\gamma$  freizusetzen, noch Peptid-tragende Zielzellen zu lysieren. Somit zeigte diese Studie, dass auch funktionell nicht-reaktive T-Zellen bei Patienten mit metastasiertem Melanom existieren. Solche T-Zellen würden bei unserem methodischen Ansatz, bei dem T-Zellen an Hand ihrer IFN- $\gamma$ -Freisetzung charakterisiert werden, zwangsläufiger Weise nicht identifiziert werden.

#### **4.4 Zusammenhang zwischen dem Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen und dem klinischen Verlauf bei Melanompatienten**

Indirekte Hinweise für die klinische Relevanz Tumor-reaktiver T-Zellen, die bei unseren Patienten nachgewiesen wurden, bietet der klinische Verlauf. Insgesamt war es bei vier von 11 Patienten bei denen wir Tumor-reaktive T-Zellen nachgewiesen hatten, zu einer spontanen oder immuntherapeutisch-induzierten Tumorregression gekommen. Hierbei könnten Tumor-reaktive T-Zellen zu einer Tumorzerstörung geführt haben. Trotz des Vorhandenseins von Tumor-reaktiven T-Zellen zeigten allerdings sieben von 11 Patienten einen progressiv wachsenden metastasierenden Tumor, eine Tatsache, der Escape-Mechanismen zugrunde liegen könnten. Leider stand im Rahmen dieser Studie kein Tumorgewebe zur Verfügung, um weitere dahingehende Analysen durchzuführen.

Diese Beobachtung korreliert mit zahlreichen bisher beschriebenen Fällen, in denen trotz nachweisbarer Tumor-gerichteter T-Zellantwort ein progredienter Tumor existierte. In einer Studie von Anichini et al. konnten z.B. trotz des Nachweises von Melan-A/Mart-1-spezifischen T-Zellen bei Melanompatienten keine Tumorregressionen beobachtet werden (ANICHINI 1999). Auch die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten durch Vakzinierungen war in den wenigsten Fällen mit einer klinischen Tumorregression assoziiert (LEE 1999(a), NIELSEN 2000(a+b)). Weitere Hinweise auf mögliche Tumor-Escape-Mechanismen konnten u.a. auch durch die Analyse des Krankheitsverlaufes einzelner Melanompatienten gewonnen werden. Bei einer Patientin, die nach Chemo- und Immuntherapien sowie Vakzinierung mit autologen Melanomzellen eine starke Tumor-spezifische CTL-Antwort entwickelte, trat erst nach ca. 3 Jahren ein Rezidiv auf. Dieser Rezidivtumor hatte fast alle HLA-Klasse-I-Moleküle verloren und entkam möglicherweise so der Kontrolle des Immunsystems (COULIE 1999). Neben veränderter MHC-Klasse-I-Expression (CORMIER 1999, FERRONE 1995, GARRIDO 1997, RIVOLTINI 1997) konnten inzwischen zahlreiche Escape-Mechanismen aufgedeckt werden (COSTELLI 1999(a+b), MARINCOLA 1997, PAWELEC 1997), so z.B. Punktmutationen, die zu Veränderungen oder Verlust des erkannten Antigens führen (JAEGER 1994, MAEURER 1996(a+b)), Störungen der Antigenprozessierung (KIESLING 1996, SELIGER 2000), Rezeptorveränderungen, die eine Apoptose-Induktion verhindern (HAHNE 1996,

WILLIAMS 1996) oder die Freisetzung von immunsuppressiven Faktoren durch Tumorzellen (SUN 1999(a)).

Da sieben von 11 in dieser Studie analysierte Melanompatienten mit Tumor-reaktiven T-Zellen bereits vorherige systemische Therapien erhalten haben, kann eine Induktion der gemessenen T-Zellantwort insbesondere durch IL-2 und IFN- $\alpha$  oder durch Tumor-Vakzine nicht ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es unter den Patienten mit Tumor-reaktiven T-Zellen auch 4 Patienten, welche im Vorfeld keine systemische Therapie erhalten haben und bei denen sich die Tumor-gerichtete T-Zellantwort spontan entwickelt haben muss.

Bei acht von 19 Patienten ließen sich in dieser Arbeit keine signifikante T-Zellantwort gegen die HLA-A1- bzw. HLA-A2-identen Tumorzelllinien nachweisen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Patienten dennoch Tumor-reaktive T-Zellen besitzen, die in ihrer Frequenz unter der von uns gesetzten Nachweisgrenze des ELISPOT-Assays liegen oder funktionell nicht nachweisbar oder anerg sind (LEE 1999(b)). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass solche Tumor-reaktiven T-Zellen nicht im peripheren Blut zirkulieren (KARANIKAS 2001) oder gegen andere, insbesondere private Antigene gerichtet sind. Denkbar wäre auch ein partieller Funktionsverlust einzelner Elemente des Immunsystems oder eine generelle Immunsuppression (ARNOLD 1993, FINKE 1999). Zahlreiche Studien konnten bei Tumorpatienten möglicherweise sekundär entstandene Dysfunktionen von T-Zellen zeigen, mit Veränderungen des T-Zell-Rezeptors, vor allem in Form von TCR-Zeta-Ketten-Herunterregulation (ZEA 1995). Außerdem können Toleranz-Mechanismen im Sinne einer peripheren T-Zell-Anergie auftreten. Auch Tc2/Th2-CD8<sup>+</sup> Effektorzellen stehen möglicherweise über eine spezifische IL-4 oder IL-10-Freisetzung der Induktion einer effektiven Tumor-gerichteten T-Zellantwort entgegen (MOSMANN 1997).

#### 4.5 Antigen-Repertoire beim Melanom

Obwohl bisher eine Reihe von definierten Antigenen als Zielstrukturen zytotoxischer T-Zellen beim Melanom charakterisiert werden konnten, sind damit wahrscheinlich längst nicht alle Tumorantigene beim Melanom definiert. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der aus dem peripheren Blut gewonnenen Melanom-reaktiven T-Zell-Klone melanosomale Antigene, eine wichtige Gruppe von Tumorantigenen beim Melanom, nicht erkennt (AARNOUDSE 1999, ANICHINI 1996, KAWAKAMI 2000, MAZZOCHI 1996). In der Studie von ANICHINI et al., in der über 100 T-Zellklone analysiert wurden, erkannten die meisten T-Zellklone HLA-A2+ allogene Melanomzelllinien, nicht jedoch Melanozyten. Ähnliche Ergebnisse konnten ebenfalls von MAZZOCHI et al. mit HLA-A3+ T-Zellklonen erzielt werden, welche HLA-A3+ Epitope auf Melanomzellen nicht jedoch von Melanozyten erkannten. Und auch von AARNOUDSE et al. und KAWAKAMI et al. wurden CTLs bzw. TILs beschrieben, die gegen allogene, in bestimmten HLA-Merkmalen übereinstimmende Tumorzelllinien reagierten, nicht jedoch gegen bekannte melanosomale Proteine. In einer weiteren Studie von IMRO et al. erkannten Tumor-spezifische CTLs keine der, mit melanosomalen Antigenen transfizierten Dendritischen Zellen (IMRO 1999).

Diese Ergebnisse lassen sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Analyse in Übereinstimmung bringen, in der die meisten Patienten gegen die Melanomzelllinie SK-Mel-24 reagierten, welche alle melanosomalen Antigene verloren hat (SLINGLUFF 1996). Insgesamt kann man aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die Mehrzahl der Melanom-spezifischen T-Zellen möglicherweise gegen bisher nicht definierte Antigene gerichtet ist, von denen die meisten keine Melanozyten-Differenzierungs-Antigene sind (GILBOA 1999). Daher ist es umso wichtiger, die Suche nach weiteren, immunogeneren Antigenen fortzusetzen und das gesamte Antigenrepertoire beim Melanom zu erforschen.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lieferte die vorliegende Studie den Nachweis von Melanom-reaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei mehr als der Hälfte der untersuchten Patienten in unterschiedlichen klinischen Situationen ihrer metastasierenden Tumorerkrankung. Diese Ergebnisse und die zahlreicher weiterer Studien sprechen dafür, dass das Immunsystem bei der Tumorbekämpfung eine wichtige Rolle spielen kann. Für das genauere Verständnis der Bedeutung dieser Immunantwort für die Tumorkontrolle und als Grundlage für die Entwicklung wirksamer Vakzinierungs-Strategien ist es notwendig, diese Tumor-reaktiven T-Zellen weiter zu charakterisieren und mehr über ihre biologische Bedeutung und Induzierbarkeit zu erfahren. Zudem dürfte die Analyse, des bei einigen Patienten beobachteten „Tumor-Escape“ wichtige Einblicke für die weitere Entwicklung Antigen-spezifischer Therapieansätze liefern.

Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen ferner die Hypothese, dass das Antigen-Repertoire beim Melanom größer ist, als bisher bekannt. Die Identifikation der Zielstrukturen dieser Melanom-gerichteten T-Zellantwort, sowie die Entwicklung wirksamerer Vakzineprotokolle für die bereits bekannten Antigene kann zur Erfolgsverbesserung von Therapieansätzen führen. Der verwendete IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay mit allogenen Tumorzellen eignet sich dabei gut als Monitoring-System für die Analyse von immunologischen T-Zell-Therapien, insbesondere bei nicht bekanntem Antigen.