

2. EIGENE ARBEITEN

2.1 Spontane, TAA-spezifische T-Zellen beim Kolorektalkarzinom

(Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM, Berger G, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C. Natural T cell response against class I epitopes of EPCAM, HER-2/neu and CEA in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60:4850-4)

Es war bis Ende der 1990er Jahre unbekannt, ob spontane T-Zell-Antworten gegen TAA im peripheren Blut von Tumorpatienten ohne vorherige Immuntherapie existieren. Die Entwicklung neuer sensitiver Labortechniken erlaubte hierzu neue Untersuchungen. In einer ersten Studie zur spontanen, respektive natürlichen T-Zell-Antwort gegen TAA haben wir Patienten mit kolorektalen Karzinomen (CRC) untersucht. Die Ag Ep-CAM, her-2/*neu* und CEA sind bei dieser Erkrankung potentielle Ziele für T-Zell-basierte Immuntherapien, da sie bei der Mehrheit der kolorektalen Tumoren überexprimiert sind. Wir haben untersucht, ob eine systemische, spontane, spezifische T-Zell-Antwort gegen diese TAA bei Patienten in verschiedenen Stadien des CRC existiert. Wir haben den IFN γ ELISPOT-Assay benutzt, um zirkulierende TAA-reaktive T-Zellen direkt ex vivo aus unstimulierten peripheren mononukleären Zellen (PBMC) zu detektieren. Wir analysierten die T-Zell-Antwort gegen drei HLA-A2-restringierte Peptidpitope der TAA Ep-CAM (GLKAGVIAV), her-2/*neu* (IISAVVGIL), and CEA (YLSGANLNL) aus dem peripheren Blut von 22 HLA-A2-positiven Patienten mit CRC und von 8 HLA-A2-positiven gesunden Probanden. Sieben der 22 Patienten jedoch keiner der acht gesunden Probanden hatten T-Zellen, die spezifisch als Antwort auf mindestens eines dieser Ag (n = 4, Ep-CAM; n = 5, her-2/*neu*; n = 6, CEA) IFN γ sezernierten. Bei drei dieser T-Zell-Antwort-positiven Patienten wurden die TAA-reaktiven T-Zellen weiter mittels 4-Farben-Durchflußzytometrie charakterisiert. Bei diesen drei Patienten hatte die Mehrheit der TAA-spezifischen T-Zellen einen CD3(+)/CD8(+)/IFN γ (+)/CD69(+)/CD45RA(+) Phänotyp. Dies entspricht aktivierten Effektor-T-Zellen, die in der Lage sind, direkt Perforin and Granzym zu sezernieren (106). T-Zell-Antworten traten in dieser Untersuchung interessanterweise ausschließlich bei Patienten mit metastasierter Erkrankung auf (0 von 9 im UICC Stadium I/II, 7 von 13 im UICC Stadien III und IV, p<0.05). Die Ergebnisse dieser ersten Studie zeigten, dass spontane T-Zell-Antworten gegen die genannten TAAs bei etwa der Hälfte der CRC-Patienten mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen, jedoch nicht bei Patienten mit limitiertem CRC auftraten.

Publikation 1

Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM, Berger G, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C.

Natural T cell response against class I epitopes of EPCAM, HER-2/neu and CEA in patients with colorectal cancer.

Cancer Res 60(17):4850-4, 2000

2.2 Vergleich der spontanen, TAA-spezifischen T-Zell-Antwort beim Mammakarzinom und beim Kolorektalkarzinom

(Nagorsen D, Scheibenbogen C, Schaller G, Leigh B, Schmittel A, Letsch A, Thiel E, Keilholz U. Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003;105:221-5)

Interessanterweise gibt es offensichtlich Unterschiede in der Generierung oder im Homing-Verhalten von T-Zellen bei verschiedenen Adenokarzinomen. Hierzu haben wir insgesamt etwa siebzig HLA-A2-positive Patienten mit CRC oder Mammakarzinom hinsichtlich einer peripheren T-Zell-Antwort gegen die drei TAA CEA, EpCAM und her-2/neu, die eine ähnliche Expression bei beiden Entitäten zeigen, mittels IFN γ -ELISPOT-Assay untersucht. Es fand sich ein komplettes Fehlen von ex vivo T-Zell-Antworten gegen diese drei TAA bei den 20 untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinom. Unsere früheren Ergebnisse für das CRC bestätigend, fanden sich TAA-spezifische T-Zellen im peripheren Blut bei 12 von 49 Patienten mit CRC (24%). Die TAA-spezifischen T-Zell-Antworten traten damit beim CRC signifikant häufiger auf als beim Mammakarzinom ($p=0.015$). Als Kontrolle durchgeführte Analysen der T-Zell-Antwort gegen Influenza zeigten, dass diese Virus-gerichteten T-Zell-Antworten bei beiden Tumorentitäten gleich waren. Die Ergebnisse unserer Studie lassen vermuten, dass es zwischen Mammakarzinom und CRC einen Unterschied in der Tumorummunogenität oder im Migrationsverhalten der Tumor-spezifischen T-Zellen gibt. Erstmals fand sich in dieser Studie eine TAA-gerichtete T-Zell-Antwort auch bei 2 von 21 Patienten (9,5%) im limitierten Stadium des CRC (UICC I und II). Die Häufigkeit der T-Zell-Antwort im metastasierten Stadium (UICC III und IV; 35,7%) war jedoch weiterhin signifikant größer als im limitierten Stadium ($p=0.035$). Die Ursache für diese Differenz ist nicht geklärt. Man kann insbesondere über die Einbeziehung der Lymphknoten in die Tumorablewehr als Voraussetzung für die Entwicklung einer systemischen T-Zell-Antwort gegen TAA diskutieren. Alternativ erscheint auch ein „Tumor Escape“ wahrscheinlicher im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, so dass dann TAA-spezifische T-Zellen eventuell nicht mehr im Tumor gebunden sind, sondern peripher nachweisbar werden. Die weitergehende Untersuchung des Einflusses des lokalen Tumormilieus auf die Entwicklung und Ausrichtung einer TAA-gerichteten T-Zell-Antwort wird hier in Zukunft wichtige Erkenntnisse bringen.

Publikation 2

Nagorsen D, Scheibenbogen C, Schaller G, Leigh B, Schmittel A, Letsch A, Thiel E, Keilholz U.

Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients.

Int J Cancer 2003;105:221-5

2.3 Einfluss der spontanen, TAA-spezifischen T-Zell-Antwort auf das Überleben beim Kolorektalkarzinom

(Nagorsen D, Scheibenbogen C, Letsch A, Germer CT, Buhr HJ, Hegewisch-Becker S, Rivoltini L, Thiel E, Keilholz U. T cell responses against tumor associated antigens and prognosis in colorectal cancer patients. J Transl Med 2005;3:3)

Obwohl viele der beschriebenen TAA-spezifischen T-Zellen einen zytotoxischen Phänotyp haben, ist nicht geklärt, inwieweit sie tatsächlich Tumorzellen *in vivo* zerstören können. In diesem Zusammenhang ist wenig darüber bekannt, ob zirkulierende, spontane, TAA-reaktive T-Zellen den klinischen Verlauf der Tumorerkrankungen beeinflussen können. In einer Follow-up-Studie haben wir 54 CRC-Patienten mittels IFN γ -ELISPOT Assay oder intrazellulärer Zytokinfärbung hinsichtlich der spontanen T-Zell-Antwort gegen HLA-A2-bindende Epitope der TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA untersucht. Danach haben wir eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt, in der T-Zell-Responder und T-Zell-Non-Responder verglichen wurden. Um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu erhöhen, wurde zusätzlich eine Gruppe von T-Zell-Non-Respondern, die - basierend auf klinischen Daten (Stadium, Alter, Dauer der Vorerkrankung) - stringent T-Zell-Responder-gepaart war, zusammengestellt und ebenfalls auf das Überleben untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, dass 16 der 54 Patienten eine T-Zell-Antwort gegen zumindest eines der TAA aufwiesen. Kein Unterschied im Überleben wurde gefunden, wenn man alle T-Zell-Responder (n = 16) und alle T-Zell-Non-Responder (n = 38) miteinander verglich (p=0.4). Um möglicherweise störende Einflüsse konfundierender klinischer Faktoren zu minimieren, verglichen wir anschließend 16 T-Zell-Responder and 16 T-Zell-Non-Responder in einer gepaarten Überlebensanalyse; auch hier fand sich kein Überlebensunterschied zwischen den beiden Gruppen (p = 0.7). Es lässt sich also sagen, dass wir keinen Hinweis darauf gefunden haben, dass das Auftreten spontaner, peripherer T-Zell-Antworten gegen die genannten HLA-A2-bindenden Epitope ein starker prognostischer Faktor für das Überleben sind. Es sei hier noch einmal auf die limitierte Aussagekraft, die sich aus der geringen Patientenzahl ergibt, hingewiesen. Weiterführende Studien mit mehr Patienten und detaillierter Analyse der Funktionalität und des Migrationspotentials der spontanen T-Zell-Antworten, könnten Einfluss auf die Entwicklung der Tumor-Vakzinetherapien haben. Dadurch könnte geklärt werden, welche klinische Rolle TAA-spezifische T-Zellen für die Immunosurveillance und die Immunstimulation spielen, und ob die Präsenz spontaner T-Zell-Antworten Einfluss auf die Effektivität von Tumorstoffen hat.

Publikation 3

Nagorsen D, Scheibenbogen C, Letsch A, Germer CT, Buhr HJ, Hegewisch-Becker S, Rivoltini L, Thiel E, Keilholz U.

T cell responses against tumor associated antigens and prognosis in colorectal cancer patients.

J Transl Med 2005;3:3

2.4 Einfluss der Tumor-infiltrierenden, regulatorischen T-Zellen auf spontane, TAA spezifische T-Zellen und das Überleben beim Kolorektalkarzinom

(Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D. In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. J Transl Med 2006, 4:52.)

Die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze gegen Tumorerkrankungen hat in den letzten Jahren Fortschritte gemacht. Es wird vermutet, dass die T-Zellen, die sich spezifisch gegen Tumorantigene richten, eine Rolle in der Vermittlung von Anti-Tumor-Effekten spielen. Wie bereits in Vorarbeiten dargelegt, existieren bereits vor jeglicher Immuntherapie spontane TAA-spezifische T-Zell-Antworten im Blut von CRC-Patienten. Es ist bislang jedoch unklar, warum diese Präsenz im peripheren Blut keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat (s.a. 2.3). Man nimmt an, dass Tregs die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor und damit auch den Verlauf einer Tumorerkrankung beeinflussen können. Die genaue Rolle der Tregs für die Entwicklung spontaner TAA-gerichteter T-Zell-Antworten ist nicht klar. Außerdem ist nicht bekannt, ob die intratumorale Präsenz von Tregs einen Einfluss auf das Überleben von CRC-Patienten hat. Das Ziel unserer Studie war es, die Treg Infiltration im CRC zu analysieren und zu untersuchen, ob diese in einem Zusammenhang mit der systemischen TAA-gerichteten T-Zell-Antwort, dem Stadium des CRC und dem Überleben der Patienten steht. Es wurden immunhistologische Färbungen für den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor FOXP3, für CD3 und für CD8 in 12 normalen Kolonproben und in 40 CRC-Proben von Patienten mit bekannter systemischer T-Zell-Antwort gegen die TAA CEA, Ep-CAM und her-2/neu durchgeführt. Die Treg Infiltration war in CRC-Proben signifikant höher als in normalem Kolongewebe. Die stromale Treg-Infiltration im CRC war signifikant höher als die epitheliale Treg-Infiltration. Des Weiteren war die Treg-Infiltration signifikant höher im limitierten Stadium (UICC I + II) verglichen mit dem metastasierten Stadium (UICC III + IV) CRC ($p=0.03$). Das ist deshalb besonders interessant, weil im limitierten Stadium wiederum weniger häufig systemische TAA-gerichtete T-Zell-Antworten beschrieben sind. Die durchschnittliche Treg-Infiltration im Tumor war hier nicht-signifikant höher bei Patienten ohne systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort. Das Überleben war nicht unterschiedlich bei Patienten mit hoher oder niedriger Treg-Infiltration. Eine direkte kausale Verbindung zwischen Treg-Infiltration im Tumor und der Entwicklung einer systemischen T-Zell-Antwort kann nicht bewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Treg Infiltration signifikant erhöht war im limitierten Stadium, in dem wiederum eine systemische TAA-gerichtete T-Zell-Antwort seltener gefunden wird.

Publikation 4

Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D.

In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer.

J Transl Med 2006, 4:52.

2.5 Charakterisierung CD8 negativer, Tetramer-bindender Zellen in der Analyse TAA-spezifischer T-Zell-Antworten

(Nagorsen D, Monsurrò V, Wang E, Marincola FM. Characterization of CD8 negative, HLA class I/epitope tetrameric complexes (tHLA) binding T cells. *J Immunotherapy* 2002;25:379-84)

Die ex vivo Detektion und Analyse TAA-spezifischer T-Zellen, insbesondere ohne vorherige Vakzinierung, stellt eine besondere technische Herausforderung dar, da die Frequenz der zu untersuchenden Zellen oft deutlich unter 1% der CD3(+)CD8(+) T-Zellen liegt. Dem entsprechend kommt der Entwicklung und Verbesserung der Methoden eine sehr wichtige Rolle zu – insbesondere da einige T-Zell-immuntherapeutische Ansätze an der Schwelle zu einer breiteren klinischen Anwendung stehen. Es gibt mittlerweile ein sehr breites Spektrum an entsprechenden T-Zell-Assays (40). In einem umfangreichen Vergleich der T-Zell-Analyse-Assays haben sich drei Methoden als zum primären Monitoring TAA-spezifischer T-Zellen geeignet erwiesen: IFN γ ELISPOT Assay, intrazelluläre Zytokinfärbung und Tetramere (39). Tetramerisierte HLA Klasse I/Epitop-Komplexe (Tetramere) stellen eine viel versprechende Technik zur direkten ex vivo Analyse von Ag-spezifischen T-Zellen auf Einzelzellniveau dar (30). Ein ganz entscheidender, limitierender Faktor ist die Spezifität dieses Assays. Wir haben hier gezeigt, dass das weit verbreitete Problem der CD8(-) Tetramer(+) Zellen auf einer Färbung von aktivierten B-Lymphozyten [87%; CD19(+), CD45RA(+), HLA-DR(+), CD20(+)] und von CD4(+) T-Zellen [13%; CD3(+), CD4(+), CD45RA(+), CD27(+)] beruht. Ein TCR wurde auf den Tetramer(+) B-Lymphozyten erwartungsgemäß nicht nachgewiesen. Die Tetramer-Färbung war nicht HLA-restringiert, da es auch bei den PBMC eines HLA-A*0201-negativen, gesunden Spenders gefunden wurde. Eine Auswertung von CD8(-) Tetramer(+) Zellen aus 243 Proben von 36 Melanom-Patienten, die eine Peptidimpfung erhalten hatten, ergab, dass das untersuchte Tetramer-Bindungsverhalten nicht vom Immunisierungsstatus der Patienten oder von dem Vorhandensein CD8(+) Tetramer(+) T-Zellen abhängt. Insgesamt liegt also eine unspezifische Bindung der Tetramere an überwiegend TCR-negative Zellen vor. Dies gilt es insbesondere zu beachten, wenn man Tetramere benutzt, um Ag-spezifische CD8(+) T-Zellen zu isolieren. Wir empfehlen, zur Isolation Ag-spezifischer CD8(+) T-Zellen einen Abwurfkanal (dump channel) zu benutzen, über den insbesondere CD20(+) B-Lymphozyten und CD4(+) T-Zellen verworfen werden.

Publikation 5

Nagorsen D, Monsurrò V, Wang E, Marincola FM.

Characterization of CD8 negative, HLA class I/epitope tetrameric complexes (tHLA) binding T cells.

J Immunotherapy 2002;25:379-84

2.6 Zytokin- und Chemokinexpressionsprofile reifender dendritischer Zellen

(Nagorsen D, Marincola FM, Panelli MC. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine* 2004;25:31-5)

APC respektive MP kommt eine wichtige Rolle bei der Induktion und der Ausrichtung einer Tumor-gerichteten T-Zell-Antwort zu. Auf der Ebene der Ag-Präsentation und der Induktion der T-Zell-Antwort scheint sich zu entscheiden, ob eine Immunantwort tatsächlich gegen den Tumor wirksam sein kann. Für die Vakzinetherapie maligner Erkrankungen werden zunehmend DC eingesetzt; dabei scheinen reife DC (mDC) potentere zytotoxische T-Zellen zu induzieren. Die Reifungsprozesse von phagozytierenden Zellen besser zu verstehen, könnte helfen, effektivere Immuntherapien zu entwickeln. Ein wichtiger Aspekt dieser Reifung ist die Zytokinsekretion, die einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung weiterer unspezifischer, aber auch spezifischer Immunantworten hat. Wir haben aus dem peripheren Blut gesunder Spender zirkulierende Monozyten gewonnen und sie für fünf Tage mit IL-4 und GM-CSF inkubiert, gefolgt von einer zweitägigen Kultur entweder mit oder ohne CD40 Ligand und LPS. Dies ist ein üblicher Weg, um in vitro mDC beziehungsweise unreife DC (iDC) zu generieren. Die entsprechenden Phänotypen wurden durchflusszytometrisch durch Messung der unterschiedlichen Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD83) verifiziert. Dann haben wir das Zytokinexpressionsprofil der mDC und iDC mittels zweier Protein-Profilings-Assays, die die gleichzeitige Analyse von mehreren Dutzend Proteinen in einem Ansatz erlauben, gemessen. Es wurden jeweils 12 Kulturüberstände von mDC und gepaarten iDC verglichen. Das Proteinexpressionsprofil zeigte bei 16 von 34 getesteten Faktoren für die mDC signifikant höhere Werte als für die iDC, darunter für TNF α , IL-10, IL-12, IFN γ , MIP1 α , MIP1 β , IL-8, MDC, RANTES und IL-6. Diese Zytokine und Chemokine spielen eine entscheidende Rolle sowohl für die Regulation der angeborenen, unspezifischen Immunantwort als auch für die Migration und Aktivierung spezifischer Immuneffektorzellen. Interessanterweise, stimmte das Proteinexpressionsprofil reifender DC teilweise mit dem Genexpressionsprofil von Tumormetastasen nach einer IL-2-Therapie überein. Das könnte bedeuten, dass die Reifung Tumor-infiltrierender DC eine Rolle in der Vermittlung systemischer IL-2-Effekte spielen könnte. Darüber hinaus ist das Wissen um die während der DC-Reifung sezernierten Zytokine und Chemokine auch für den Einsatz reifer und unreifer DC zur Vakzinierung wichtig.

Publikation 6

Nagorsen D, Marincola FM, Panelli MC.

Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays.

Cytokine 2004;25:31-5

2.7 Einfluss von Chemokinen und Zytokinen auf Transkriptionsmuster aktivierter Monozyten

(Nagorsen D, Wang E, Monsurrò V, Marincola FM, Panelli MP. Polarized monocyte response to cytokine stimulation. *Genome Biology* 2005;6:R15)

Nicht nur DC sind für das Zytokin- und Chemokinmilieu in einem Tumor verantwortlich. MP selbst sind im Tumor-Mikroenvironment einer ganzen Bandbreite von Zytokinen und Chemokinen ausgesetzt, die von allen Anteilen des Tumors, also Immunzellen, Stroma und dem Tumor selbst sezerniert werden können. Diese Zytokine haben Einfluss auf die Ausprägung der MP. Wie oben bereits ausgeführt, lassen sich TAMs entweder als "zytotoxisch" (M1, Tumor-zerstörend, Effektorzellen-anlockend und Ag-präsentierend) oder als "symbiotisch/immunsuppressiv" (M2, entzündungsbegrenzend, zur Tumorphilisation beitragend) beschreiben (65). Deshalb testeten wir, ob eine polarisierte Immunantwort der MP auf einen pathogenen Reiz auf den Einfluss einzelner Zytokine zurückzuführen ist, oder ob es sich mehr um ein generelles Prinzip handelt, MP zu polarisieren; letztlich, ob es einen kontinuierlichen Übergang zwischen den Aktivierungen durch die verschiedenen Zytokine gibt oder ob es Gruppen von Zytokinen gibt, die durch eine Art molekularen Schalter auf die MP polarisierend wirken. Aus dem peripheren Blut isolierte, zirkulierende CD14(+) MP wurden zunächst mit LPS stimuliert. Nachfolgend setzten wir die MP 42 verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und weiteren löslichen Immunfaktoren aus. Die Genexpression wurde mittels Mikroarrays (global transcript analysis) untersucht. Zwei Zytokinhauptklassen wurden identifiziert, die entweder den klassischen (IFN γ , M1) oder den alternativen Weg (IL-4, M2) der MP Aktivierung induzierten. Dabei gruppieren sich zum Beispiel die Faktoren IL-2, IL-6 und MIP1 α um IFN γ und die Faktoren IL-12, RANTES und TGF β um IL-4. Eine kleinere, dritte Gruppe von Zytokinen um IL-10 stellte eine weitere Klasse dar, die wir „alternativ 2“ genannt haben. Vertreter hierbei sind neben IL-10 unter anderem noch IL-13 und IL-15. Die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der NF κ B Aktivierung stehen, war am prädikativsten für die beiden Zytokinhauptklassen. Dieser Befund legt nahe, dass der NF κ B Weg das hauptsächliche Ziel der Zytokinregulation ist. Diese gesamte Analyse gibt Informationen über den primären Effekt individueller Zytokine auf MP in der frühen Phase der LPS-Stimulation und zeigt, wie die Reifung der MP in frühen Stadien der Immunantwort polarisiert wird.

Publikation 7

Nagorsen D, Wang E, Monsurrò V, Marincola FM, Panelli MP.

Polarized monocyte response to cytokine stimulation.

Genome Biology 2005;6:R15

2.8 Epitopauswahl durch rekombinante Vacciniavirus-infizierte reife und unreife dendritische Zellen

(Nagorsen D, Panelli MC, Dudley ME, Finkelstein SE, Rosenberg SA, Marincola FM. Biased epitope selection by recombinant vaccinia-virus (rVV)-infected mature or immature dendritic cells. *Gene Therapy* 2003;10:1754-65)

Neben der Zytokin-Makrophagen-Interaktion sind selbstverständlich weitere Mechanismen für die Ausprägung einer Immunantwort wichtig. Die Induktion einer Immunantwort gegen TAA basiert auch auf einer effektiven Epitopräsentation durch APC. Für die Immuntherapie stellen rekombinante Expressionsvektoren einen interessanten Weg zur Präsentation ganzer Ag zur Immunisierung dar. Eine Ag-Expression durch Vektor-infizierte DC kombiniert die Ag-spezifische Stimulation mit einer ausgeprägten Kostimulation. Dabei kann gleichzeitig auch durch Selektion von ad hoc Epitopen das Spektrum der Immunisierung über den individuellen HLA-Typ eines Patienten hinaus erweitert werden. Wir testeten die Effektivität eines rekombinanten Vacciniavirus (rVV), das zusätzlich das Melanomantigen gp100/PMel17 kodierte (rVV-gp100), mDC und iDC zu infizieren. Wir analysierten auch den Effekt der Infektion auf den Reifungszustand der DC. Zusätzlich untersuchten wir die Fähigkeit der rVV-gp100-infizierten iDC und mDC, das HLA-A*0201-assoziierte gp100:209-217 Epitope (g209) zu präsentieren. Unabhängig vom Status der Reifung induzierte die rVV-gp100 Infektion eine gp100-Expression; einige Reifungsmarker wurden durch die Infektion teilweise herunterreguliert. Allerdings war die endogene Präsentation des Wildtyp-Epitops g209 ineffizient. Diese niedrige Effizienz der Präsentation war Epitop-spezifisch, da die Infektion von DC mit einem rVV, das das modifizierte (T zu M Substitution an Position 2 des antigenen Nonamers), durch hohe HLA-A*0201 Bindung charakterisierte gp100:209-217(210M) (g209-2M) kodierte, eine effektive Ag-Präsentation zeigte. Die niedrige Effizienz der Präsentation kann auch als Epitop-spezifisch gelten, weil die Präsentation eines HLA-Klasse II-assoziierten Epitops und die Zytokinausschüttung der DC nicht durch die rVV-Infektion beeinflusst wurden. Zusammengefasst heißt das, dass die Ag-Expression durch rVV eine interessante Strategie zur Applikation ganzer Ag ist. Da allerdings die Effektivität der Ag-Prozessierung und -Präsentation dem stringenten Zueinanderpassen von HLA und Epitop sowie eventuell noch weiteren Mechanismen unterliegt, ist die Annahme, dass die Applikation ganzer Ag das Problem der HLA-Restriktion umgeht, falsch. Rekombinante Expressionsvektoren, die mehrere gut charakterisierte Epitope enthalten (Polyepitopkonstrukte), könnten sich als effektiver erweisen.

Publikation 8

Nagorsen D, Panelli MC, Dudley ME, Finkelstein SE, Rosenberg SA, Marincola FM.

Biased epitope selection by recombinant vaccinia-virus (rVV)-infected mature or immature dendritic cells.

Gene Therapy 2003;10:1754-65

2.9 Immunogenität und proteasomale Spaltung der TAA-gp100-Peptide g209 und g209-2M

(Nagorsen D, Servis C, Lévy N, Provenzano M, Dudley ME, Marincola FM, Lévy F. Proteasomal cleavage does not determine immunogenicity of gp100-derived peptides gp100:209-217 and gp100:209-217T210M. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:817-24)

Wie oben ausgeführt, ist das g209-Epitop des Melanom-assoziierten Ag gp100 nur durch niedrige bis mittlere HLA-A*0201-Affinität gekennzeichnet (107). Dieses Epitop ist zwar ein natürliches T-Zell-Target, aber es induziert nur mit geringer Effizienz T-Zell-Antworten während einer Immunisierung. Das ebenfalls bereits erwähnte, modifizierte gp100 Epitop g209-2M ist durch eine hohe HLA-A*0201 Affinität gekennzeichnet; und es induziert starke T-Zell-Antworten. Diese höhere HLA-A*0201 Affinität wird oft als einziger Grund für die gesteigerte Immunität gesehen. In anderen Ag-Systemen hat man allerdings eine unvorhersehbare Beziehung zwischen Affinität und Immunogenität gefunden. Zusätzlich haben wir in der unter 2.8 aufgeführten Studie einen ganz erheblichen Unterschied in der Fähigkeit, Immunantworten hervorzurufen, zwischen den beiden Epitopen gesehen. Darum haben wir untersucht, ob auch noch weitere Faktoren als die HLA-A*0201 Affinität eine Rolle für die Immunogenität dieser Epitope spielen. Wir haben in vitro die proteasomale Spaltung der 23meren Vorläuferpeptide, die die native Sequenz (gp100(201-223)) oder die modifizierte Sequenz (gp100(201-223T210M)) enthielten, untersucht. Wir konnten zeigen, dass das Standardproteasom zwar die C-Termini beider Peptide, nicht aber die N-Termini freisetzt. Quantitative Analysen zeigten, dass von dem Wildtyp-Vorläuferpeptid mehr Fragmente mit dem freigesetzten C-Terminus produziert wurden als vom modifizierten Vorläuferpeptid. Eine stärkere T-Zell-Aktivierung wurde allerdings beobachtet, wenn die Spaltprodukte des Proteasom-verdauten gp100(201-223T210M) verwendet wurden. Dieser Unterschied wurde ebenso gefunden, wenn separat synthetisch hergestellte Nonamere verwendet wurden. Insgesamt scheint die höhere HLA-Affinität des modifizierten Epitops (g209-2M) sogar mögliche Unterschiede im proteasomalen Spaltungsverhalten zu kompensieren. Da die eigentlichen antigenen Nonamere nicht direkt durch das Proteasom produziert werden, könnten weitere Faktoren, wie post-proteasomale Prozessierung und intrazellulärer Peptidtransport, die Peptidpräsentation beeinflussen.

Publikation 9

Nagorsen D, Servis C, Lévy N, Provenzano M, Dudley ME, Marincola FM, Lévy F.

Proteasomal cleavage does not determine immunogenicity of gp100-derived peptides gp100:209-217 and gp100:209-217T210M.

Cancer Immunol Immunother 2004;53:817-24

2.10 Übersicht zum Stand der aktiven spezifischen Immunisierung beim fortgeschrittenen, humanen Kolorektalkarzinom

(Nagorsen D, Thiel E. Clinical and immunological responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. Clin Cancer Res 2006 12:3064-9)

Letztlich sollen Untersuchungen zur Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem nicht nur zu einem besseren akademischen Verständnis, sondern auch zu einem klinischen Fortschritt durch Immuntherapien für Patienten mit malignen Erkrankungen führen. Das CRC ist eine häufige maligne Erkrankung, die trotz einiger Fortschritte in letzter Zeit, verbesserte Therapien erfordert. Verschiedene klinische Studien beim CRC haben eine aktive spezifische Immuntherapie, d.h. eine Vakzinierung mit dem Ziel der Induktion einer eigenen, in vivo generierten Immunantwort, getestet. Wir haben eine systematische Übersicht erarbeitet, um die objektiven klinischen Ansprechraten und das immunologische Ansprechen im Rahmen klinischer Studien zur aktiven spezifischen Immuntherapie beim CRC zu evaluieren. Kriterien zum Einschluss in diese Übersichtsarbeit waren: Patienten mit CRC; eine aktive spezifische Immuntherapie mit dem Ziel, eine Immunantwort zu induzieren; eine messbare Tumormasse (d.h. fortgeschrittenes bzw. metastasiertes CRC) und eine präzise Klassifizierung von Patient, Erkrankung und Ansprechen. Primäre Endpunkte waren die objektive klinische Ansprechrate und die Rate immunologischen Ansprechens. Sekundäre Endpunkte waren die Verteilung des immunologischen und klinischen Ansprechens in Bezug auf die Applikationsform und die Art der Vakzine. Zweiunddreißig Phase I/II-Studien mit 527 Patienten mit fortgeschrittenem CRC wurden eingeschlossen. Die Vakzinierung bestand aus einem breiten Spektrum verschiedener Substanzen, wie autologen Tumorzellen, Peptiden, DC, idiotypischen Antikörpern oder Virus-basierten Vakzinen. Die Gesamtanalyse zeigte eine klinische Ansprechrate (komplette Remission und partielle Remission) von 0,9 % für Patienten mit fortgeschrittenem CRC nach aktiver spezifischer Immunisierung. So genannte mixed oder minor responses (also ein Schrumpfen des Tumors an einigen Stellen oder in sehr geringem Maße) und Krankheitsstabilisierungen wurden bei insgesamt 10,2% der Patienten beschrieben. Humorale Immunantworten waren positiv bei 59%; zelluläre Immunantworten waren positiv bei 44% der Patienten. Diese Übersicht zeigt die starke Diskrepanz zwischen immunologischem und klinischem Ansprechen nach Vakzinierung beim CRC und unterstreicht die Notwendigkeit intensiverer Forschung zum Grundlagenverständnis der Immunologie des CRC. In Subsetanalysen zeigten sich Befunde, die eher für eine Multi-epitop-vakzine und eine individualisiertere Immuntherapie sprechen.

Publikation 10

Nagorsen D, Thiel E.

Clinical and immunological responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer.

Clin Cancer Res 2006 12:3064-9