

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Auseinandersetzung des Immunsystems mit neoplastischen Zellen ist seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Im Wesentlichen gibt es zwei Hauptannahmen zu dieser Interaktion. Die eine Theorie besagt, dass das Immunsystem durch Entzündungsreize, wie zum Beispiel Zytokine, zu Proliferation und Metastasierung eines Tumors beitragen kann (Immunstimulation); die andere Theorie hingegen geht davon aus, dass das Immunsystem einen protektiven Effekt hat und das Tumorwachstum überwachen und, wenn vielleicht nicht komplett verhindern, so doch zumindest eingrenzen kann (Immunosurveillance). In der vorliegenden Habilitationsschrift wurden zwei wesentliche Elemente der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystems näher untersucht: Antigen (Ag)-spezifische T-Zellen und Ag-präsentierende Zellen. Diese Zellpopulationen spielen sowohl für die spontane Entwicklung Tumor-gerichteter Immunantworten als auch für Entwicklung immuntherapeutischer Strategien gegen Tumoren eine wichtige Rolle.

Bis vor einigen Jahren war es unklar, ob T-Zellen, die sich spezifisch gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) richten, im Blut von Tumorpatienten ohne vorherige Immuntherapie vorhanden sind. Wir konnten nachweisen, dass solche spezifischen T-Zellen im peripheren Blut von Kolorektalkarzinom (CRC)-Patienten existieren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich im peripheren Blut von CRC-Patienten deutlich häufiger TAA-spezifische T-Zellen finden lassen als im Blut von Mammakarzinompatientinnen. Die Ursache für diese Beobachtung bleibt unklar, könnte jedoch im unterschiedlichen Tumor-Mikroenvironment oder in einem unterschiedlichen Homing-Verhalten der T-Zellen liegen. Die gegen die TAA CEA, EpCAM und her-2/neu gerichteten T-Zellen beim CRC konnten einem zytotoxischen Zelltyp zugeordnet werden. Es war zudem besonders auffällig, dass diese T-Zellen signifikant häufiger im metastasierten Stadium des CRC auftraten. Lymphknotenkontakt des Tumors als Voraussetzung für die Entwicklung einer T-Zell-Antwort und Tumor Escape Mechanismen sind potentielle Ursachen für diesen Befund. Ein Überlebensvorteil für die Patienten mit spontanen TAA-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut konnte nicht gezeigt werden. Ebenso konnte kein direkter Zusammenhang der systemischen, TAA-spezifischen T-Zell-Antwort mit einer lokalen Infiltration durch regulatorische T-Zellen (Treg) nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Treg-Infiltration im Tumor signifikant erhöht im limitierten Stadium des CRC, in dem wiederum auch weniger häufig systemische, TAA-gerichtete T-Zell-Antworten beschrieben sind. Dies

könnte ein Hinweis auf einen indirekten Zusammenhang zwischen den beiden Zell- Populationen sein. Eine der mittlerweile gängigsten Methoden zur Analyse TAA-spezifischer T-Zellen ist die Tetramer-Färbung. In einer Methodenarbeit haben wir herausgearbeitet, dass CD20 und CD4 als Marker für eine negative Selektion zur Erhöhung der Spezifität des Assays verwendet werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte Ag-präsentierender Zellen (APC) mit besonderem Bezug zu tumorimmuntherapeutischen Überlegungen untersucht. Im Rahmen von Vakzinierungen gegen maligne Erkrankungen werden häufig reife DC verwendet, um eine besonders starke Immunantwort zu induzieren. Wir haben das Zytokin-Repertoire, das während der Reifung der DC sezerniert wird, mittels Protein-Profilings Assays untersucht und dabei Zytokine und Chemokine nachgewiesen, die die Ag-Aufnahme und die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems vermitteln (TNF α , IL-10, IL-12, IFN γ), verschiedene Immunzellpopulationen anlocken (MIP1 α , MIP1 β , IL-8, MCP-1, MDC, RANTES, MIG, IP-10, Eotaxin) und schließlich T-Zellen aktivieren (IL-2, IL-6, IL-7). Es ist anzunehmen, dass sich die DC während einer *in vitro* Reifung in Bezug auf ihre Zytokinausschüttung erschöpfen. APC selbst sind *in vivo* auch einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen im Rahmen eines Entzündungsprozesses oder einer Tumor-Immunsystem-Interaktion ausgesetzt. In einer Genexpressionsanalyse haben wir gezeigt, dass LPS-aktivierte mononukleäre Phagozyten (MP) durch eine große Bandbreite von Zytokinen und Chemokinen stark polarisiert stimuliert werden. Zwei Zytokin Hauptklassen wurden identifiziert, die entweder den klassischen (IFN γ , M1) oder den alternativen Weg (IL-4, M2) der MP Aktivierung induzierten. Unsere Befunde legen zudem eine zentrale Rolle des NF κ B in der Steuerung der MP-Aktivierung/Differenzierung nahe.

Neben der Zytokin-APC-Interaktion ist auch eine effektive Epitopräsentation für die Ausprägung einer Immunantwort wichtig. Wir haben ein rekombinantes Vacciniavirus als Vektor verwendet, um das TAA gp100 in DC zu exprimieren. Das Ag ließ sich in reifen und unreifen DC vergleichbar gut exprimieren. Die Reifungsmarker der DC wurden nach der Infektion nur wenig herunterreguliert. Die spezifische T-Zell-Stimulation war mit dem nativen gp100 Epitop g209 jedoch sehr gering, konnte allerdings durch Verwendung des modifizierten, stärker HLA-bindenden gp100 Epitops g209-2M wiederhergestellt werden. Die direkte T-Zell-Stimulation durch reife und unreife DC war dabei gleich. Eine rVV-Infektion zur Expression von Ag kann also durchaus nach der DC Reifung erfolgen. In einer weiteren

Analyse fanden wir, dass die erhöhte HLA-Affinität des modifizierten gp100 Epitops sogar eine geringere proteasomale Spaltung kompensieren kann. Die HLA-Affinität des Epitops scheint einer der zentralen Punkte für die Aktivierung von T-Zellen zu sein.

Schließlich haben wir in einer Übersichtsarbeit, die über 500 Patienten mit metastasiertem CRC einschloss, die klinische und immunologische Wirksamkeit einer aktiven spezifischen Immunisierung evaluiert. Während sich humorale und zelluläre Immunantworten bei etwa 50% der Patient zeigten, fand sich nur bei etwa 1% der Patienten ein komplette oder partielle Remission des CRC.

Die Debatte um Immunstimulation und Immunosurveillance von Tumoren wird nicht so bald beendet sein. Wahrscheinlich treten im zeitlichen Verlauf einer Tumorerkrankung gegensätzliche – tumortoxische wie proliferogene - Funktionen des Immunsystems auf. Hier wurde gezeigt, dass das CRC grundsätzlich ein immunogener Tumor ist, gegen dessen Antigene sich eine spontane T-Zell-Antwort entwickeln kann. Es scheinen bisher jedoch weder die spontanen noch die Vakzine-induzierten T-Zell-Antworten im peripheren Blut einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben. Es wird aber auch klar, dass das Immunsystem ein großes Potential für die Erkennung und damit die Behandlung von Tumoren hat. Die vorgelegten Arbeiten leisten wichtige Beiträge nicht nur zur Analyse TAA-spezifischer T-Zellen bei Tumoren sondern auch zum Verständnis der Rolle der Zytokine bei der Aktivierung Ag-präsentierender Zellen und zu Mechanismen der Epitop-Präsentation durch DC. Diese Informationen stellen Grundlagen für die rationale, dringend notwendige Weiterentwicklung immuntherapeutischer Ansätze bei malignen Erkrankungen dar.