

3 ERGEBNISSE

3.1 Methodenetablierung

Zur Durchführung dieser Arbeit war eine Methode erforderlich, die Antigen-reaktive Zellen auf Einzelzellniveau mit möglichst niedriger Nachweisgrenze detektiert und darüber hinaus die simultane Darstellung des Phänotyps erlaubt. Der Nachweis Antigen-induzierter Zytokinsynthese und die simultane Charakterisierung spezifischer T-Zellen ist sowohl mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung (IZ-DZ), als auch mit dem Secretionassay® (S-DZ) möglich. Die Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen mit diesen beiden durchflußzytometrischen Methoden wurde mit dem IFN γ -ELISPOT-Assay verglichen.

3.1.1 Auswahl der Spender

Die Methodenetablierung erfolgte mit Influenza-reaktiven MNZ gesunder Probanden, die mit dem HLA-A2.1-bindenden Nonapeptid IMP 58-66 koinkubiert wurden. Deshalb wurden nur Zellen HLA-A2.1 positiver Spender eingesetzt, deren HLA-Typ serologisch mit Hilfe des Mikrolymphozytotoxizitäts-Testes im HLA-Markerlabor des Hämatologischen Zentrallabors am UKBF bestimmt wurde.

Vor der Durchführung der Testserien wurde die IMP 58-66-Reaktivität im IFN γ -ELISPOT-Assay nachgewiesen. Es wurden nur Spender ausgewählt, die im ELISPOT eine positive T-Zell-Antwort zeigten. Eine T-Zell-Antwort wurde als positiv gewertet, wenn in der stimulierten Probe mindestens doppelt so viele IFN γ -sezernierende Zellen wie in die Negativkontrolle gezählt wurden.

3.1.2 Ermittlung der Anzahl der CD8+ Lymphozyten

Im ELISPOT-Assay entspricht jeder Punkt der ehemaligen Position einer Zytokin-sezernierenden T-Zelle. Die Frequenz der detektierten Punkte ist also gleich der Anzahl der reaktiven, also Zytokin-sezernierenden T-Zellen. Im Folgenden wird die Frequenz der Antigen-reaktiven T-Zellen im ELISPOT-Assay angegeben als Prozent der CD8+ T-Zellen jedes Spenders. Der Prozentsatz der CD8+ Lymphozyten wurde mittels Durchflußzytometrie bei jedem Spender bestimmt. Nach Färbung der MNZ mit Anti-CD3-PerCP- und Anti-CD8-APC-mAks, wurde die Anzahl der CD3+CD8+-Lymphozyten bestimmt und als Prozentsatz der insgesamt eingesetzten MNZ ausgedrückt.

3.1.3 Frequenz der IMP 58-66-reaktiven T-Lymphozyten im ELISPOT-Assay

Die Anzahl der IMP 58-66-reaktiven T-Zellen in 1×10^6 MNZ jedes der sechs Spender wurde mit dem IFN γ -ELISPOT-Assay ermittelt. Jede Messung wurde zweimal wiederholt. Jedes Mal wurden MNZ desselben Datums der Blutabnahme eingesetzt. Eine Negativkontrolle mit unstimulierten MNZ und eine Positivkontrolle mit PWM (einem Mitogen) stimulierten Zellen wurde mitgeführt. Die Anzahl der IFN γ -produzierenden Zellen in der unstimulierten Probe wurde von der Frequenz der Peptid-stimulierten MNZ subtrahiert.

Die Anzahl der IMP 58-66-reaktiven Zellen, abzüglich der Werte der Negativkontrolle lag bei den sechs Spendern zwischen 0,02% und 0,23% der CD8+ T-Zellen. Der Mittelwert betrug 0,09%, die Standardabweichung des Mittelwertes 0,02% ($n=18$). In den unstimulierten Proben lag die Anzahl der IFN γ -positiven T-Zellen zwischen 0,00% und 0,02%, der Mittelwert beträgt 0,01% und die Standardabweichung des Mittelwertes 0,003% ($n=18$) CD8+-T-Zellen. Für alle Spender zeigt sich sowohl in der stimulierten Probe als auch in der unstimulierten Probe eine hohe Reproduzierbarkeit der Frequenzen der Influenza-spezifische T-Zell-Antwort, wie in **Abbildung 3.1** wiedergegeben ist.

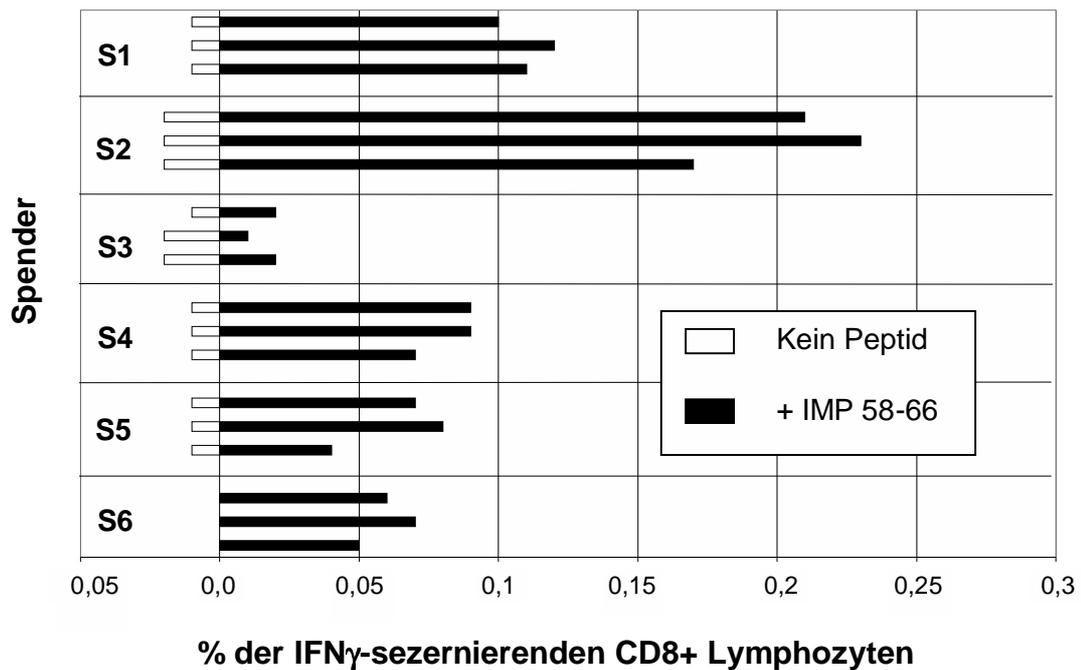


Abbildung 3.1 Frequenzen und Reproduzierbarkeit der T-Zell-Antwort gegen Influenza mit dem ELISPOT-Assay

Die MNZ von sechs gesunden Spendern wurden dreimal mit IMP 58-66-Peptid stimuliert und die Frequenzen im ELISPOT-Assay gemessen. Der Prozentsatz der Peptid-reaktiven T-Zellen wird durch einen schwarzen Balken präsentiert. Die IFN γ + Zellen in der unstimulierten Probe sind als weißer Balken dargestellt und wurden von der Peptid-stimulierten Probe abgezogen.

3.1.4 Frequenz und Reproduzierbarkeit der T-Zell-Antwort gegen Influenza mit der intrazellulären Zytokindetektion

Der prozentuale Anteil der IMP 58-66-reaktiven T-Zellen der selben sechs Spender wurde nach intrazellulärer Zytokinfärbung durchflußzytometrisch bestimmt. Die MNZ stammten vom selben Datum der Blutabnahme wie die im ELISPOT-Assay eingesetzten. Wiederum wurde jeder Versuch mit MNZ desselben Datums zweimal wiederholt. Zusätzlich wurde bei jedem Spender ein unstimuliertes Aliquot der MNZ als Negativkontrolle und ein PWM-stimuliertes Aliquot als Positivkontrolle mitgeführt. Alle Proben wurden mit derselben Antikörperkombination, anti-IFN γ -FITC-mAK und anti-CD8-APC-mAK gefärbt.

Die Frequenzen der Peptid-reaktiven MNZ liegen zwischen 0,01% und 0,35% der CD8+-Lymphozyten. Der Mittelwert \pm der Standardabweichung des Mittelwertes beträgt $0,10 \pm 0,04\%$ in $n=18$ Proben. Die Anzahl IFN γ -positiver Zellen in den unstimulierten Proben liegt zwischen 0,00% und 0,03% der CD8+ T-Zellen, $0,01 \pm 0,004\%$ sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Reproduzierbarkeit für alle Spender sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Ansätzen war zufriedenstellend und ist mit den Frequenzen in **Abbildung 3.2** wiedergegeben, in **Abbildung 3.3** ist ein ausgewähltes Beispiel der S-DZ dargestellt.

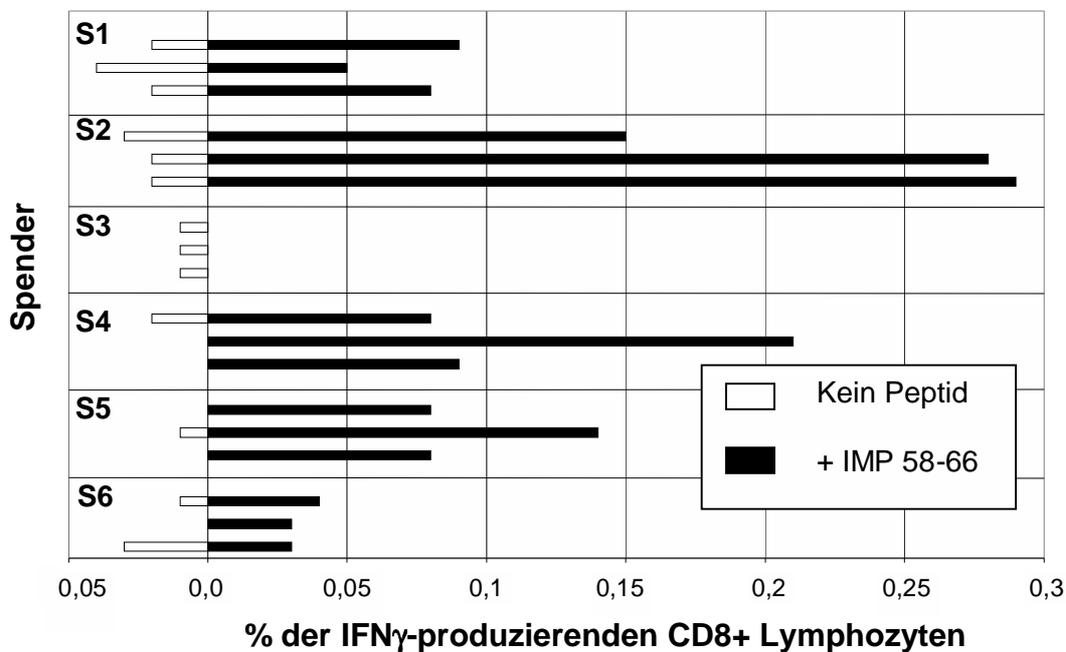


Abbildung 3.2 Frequenzen und Reproduzierbarkeit der T-Zell-Antwort gegen Influenza mit der IZ-DZ

Die MNZ von sechs gesunden Spendern wurden dreimal mit dem IMP58-66 stimuliert und die Frequenzen im IZ-DZ gemessen. Der Prozentsatz der Peptid-reaktiven T-Zellen wird durch einen schwarzen Balken präsentiert. Die IFN γ + Zellen in der unstimulierten Probe sind als weißer Balken dargestellt und wurden von der Peptid-stimulierten Probe abgezogen.

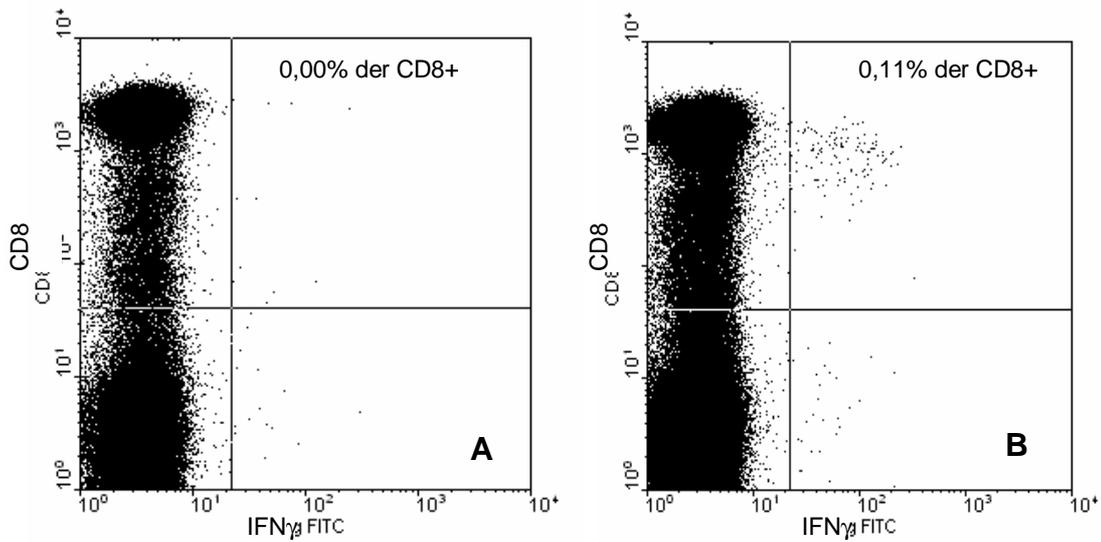


Abbildung 3.3 Analyse der IMP 58-66-reaktiven T-Zellen mit der IZ-DZ

Darstellung der unstimulierten (**A**) und IMP58-66-stimulierten (**B**) MNZ eines repräsentativen Spenders (S4) mit der IZ-DZ. Die Prozentzahlen der IFN γ +CD8+ Lymphozyten sind jeweils angegeben.

3.1.5 Frequenz und Reproduzierbarkeit der T-Zell-Antwort gegen Influenza mit dem Sekretionassay®

Auch mit dem Sekretionassay® wurden die Frequenzen der IMP 58-66-reaktiven T-Zellen der sechs Spender bestimmt. Wie auch bei den Untersuchungen mit dem ELISPOT-Assay und der IZ-DZ stammten alle MNZ von dem selben Datum der Blutabnahme und die Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt.

Die IMP 58-66 stimulierten MNZs zeigen Frequenzen IFN γ -sezernierender T-Zellen zwischen 0,81% und 5,21% der CD8+T-Zellen, der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes liegen bei $2,03\% \pm 0,65\%$. Die Anzahl der IFN γ -positiven T-Zellen in der Negativkontrolle beträgt zwischen 0,51% und 5,39% der CD8+ T-Zellen, $2,03 \pm 0,65\%$. Für den Sekretionassay® konnte nur eine sehr geringe Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Frequenzen und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gibt **Abbildung 3.4** wieder, in **Abbildung 3.5** ist ein ausgewähltes Beispiel der S-DZ dargestellt.

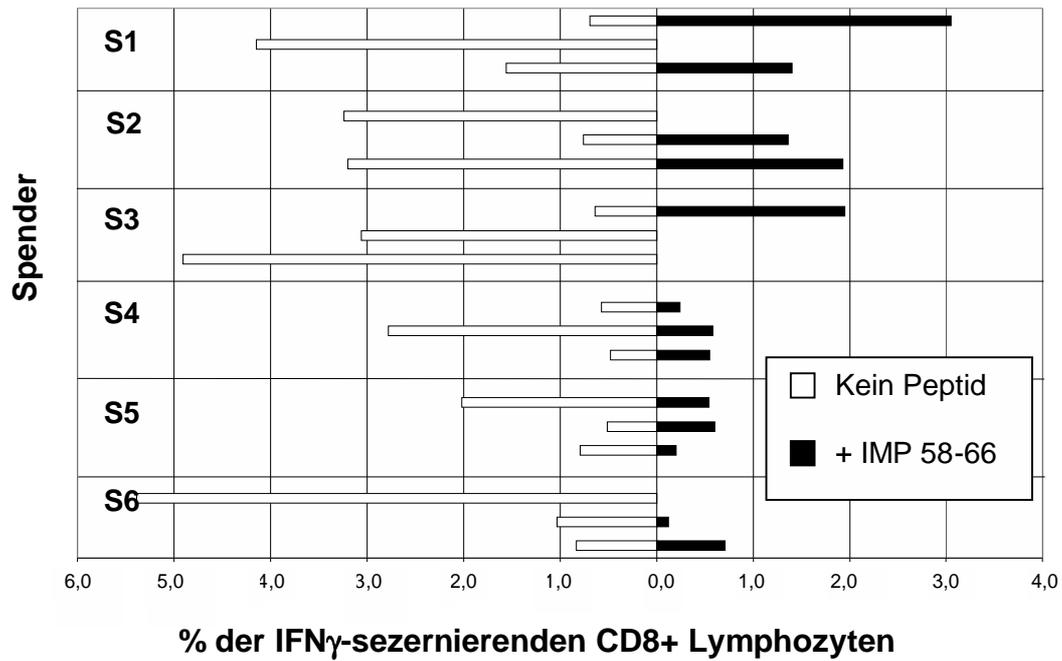


Abbildung 3.4 Frequenzen und Reproduzierbarkeit der T-Zell-Antwort gegen Influenza mit der S-DZ

Die MNZ von sechs gesunden Spendern wurden dreimal mit dem IMP58-66 stimuliert und die Frequenzen im S-DZ gemessen. Der Prozentsatz der Peptid-reaktiven T-Zellen wird durch einen schwarzen Balken präsentiert. Die IFN γ + Zellen in der unstimulierten Probe sind als weißer Balken dargestellt und wurden von der Peptid-stimulierten Probe abgezogen.

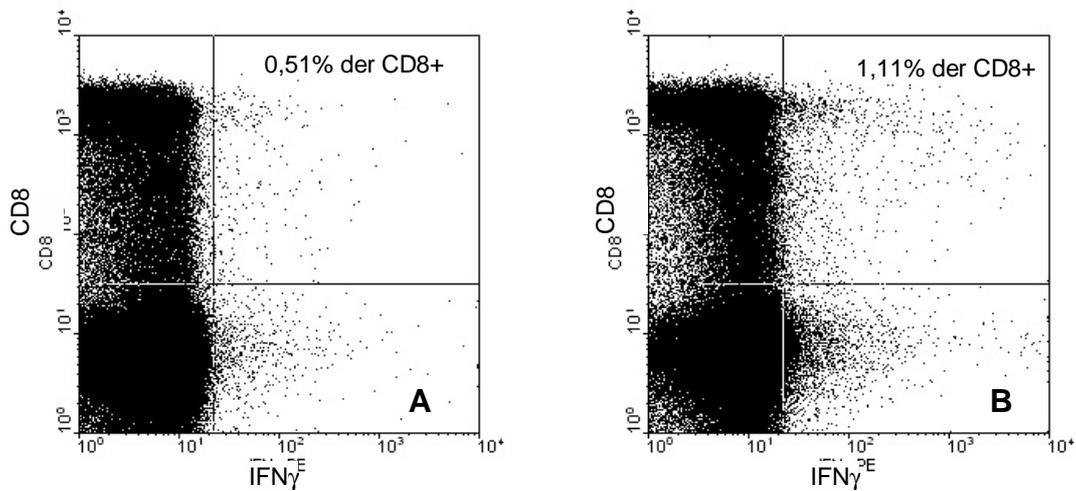


Abbildung 3.5 Analyse der IMP 58-66-reaktiven T-Zellen mit der S-DZ

Darstellung der unstimulierten (**A**) und IMgP58-66-stimulierten (**B**) MNZ eines repräsentativen Spenders (S4) mit der S-DZ. Die Prozentzahlen der IFN γ +CD8+ Lymphozyten sind jeweils angegeben.

3.1.6 Vergleich der Ergebnisse der drei untersuchten Methoden

Die Korrelation zwischen dem IFN γ -ELISPOT-Assay und den durchflußzytometrischen Methoden wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt. Die Ergebnisse des IFN γ -ELISPOT-Assays und der intrazellulären Zytokinbestimmung korrelieren signifikant ($p < 0,01$, $r = 0,988$). Im Gegensatz dazu konnte keine Korrelation der Ergebnisse des IFN γ -Secretionassays mit denen des IFN γ -ELISPOT-Assay gezeigt werden ($p = 0,354$, $r = 0,232$). Die **Abbildung 3.6** zeigt die Korrelation der T-Zell-Frequenzen, die mit den drei Assays gemessen wurden.

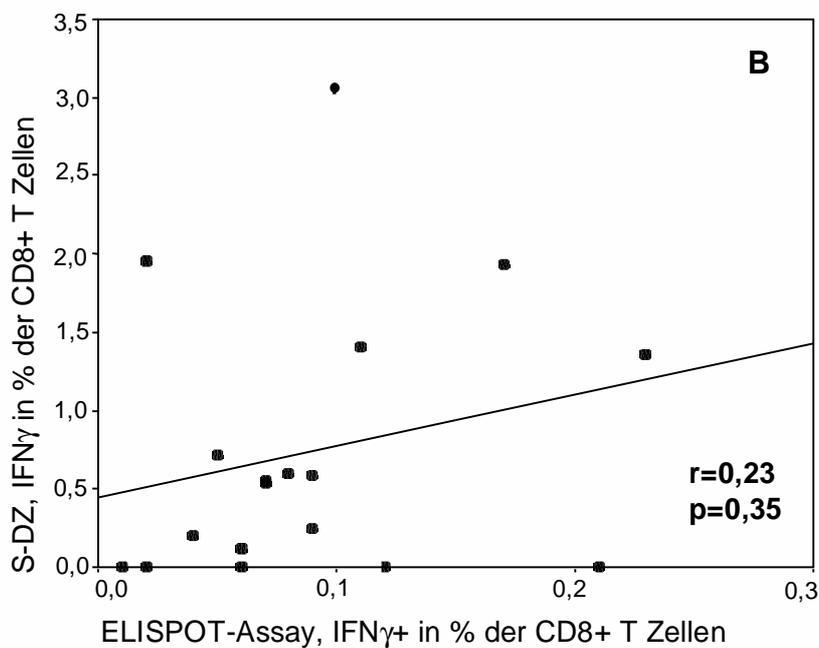
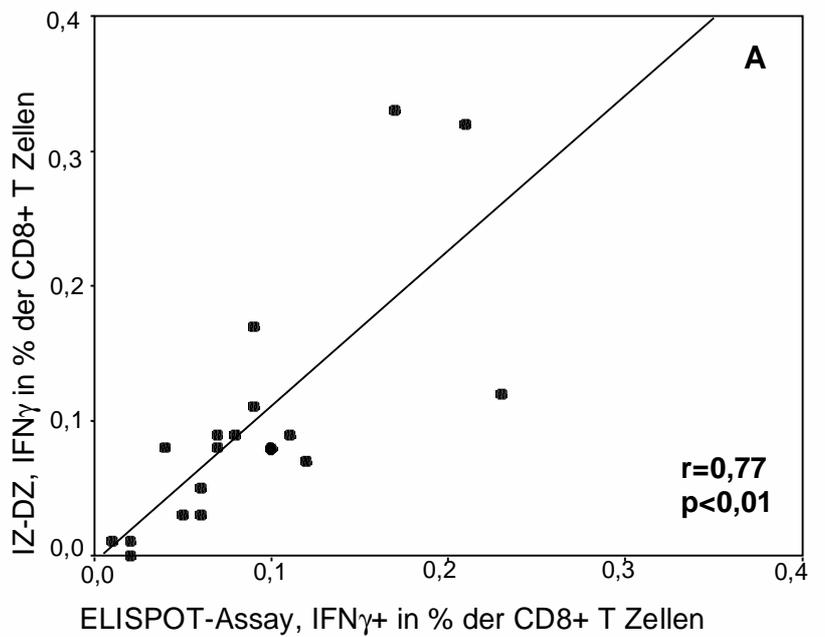


Abbildung 3.6 Korrelation zwischen dem ELISPOT-Assay und der IZ-DZ (A) bzw. der S-DZ (B).

Die Punktdiagramme zeigen die Korrelationen der Frequenzen der Influenza-reaktiven CD8+ T-Zellen aus drei Experimenten die bei jedem der sechs Spender durchgeführt wurden und mit dem ELISPOT-Assay, dem IZ-DZ und dem S-DZ bestimmt wurden.

3.1.7 Analyse des Hintergrundes im IFN γ -Sekretionstest

Auffällig ist der starke Hintergrund in der unstimulierten Probe des S-DZ. Folgende Ursachen sind denkbar und wurden durch Kontrollexperimente diskriminiert:

Zunächst wurde eine mögliche starke unspezifische Bindung des anti-IFN γ -FITC-mAks aus dem Sekretionassay®-Kit untersucht: Je eine unstimulierte und eine PWM-stimulierte Probe der Spender 2, 3 und 6 (entsprechend einer geringen, einer mäßigen und einer starken IFN γ -Produktion im ELISPOT-Assay) wurden ohne vorherigen Inkubation mit dem bispezifischen mAK nur mit dem anti-IFN γ -mAK aus dem Sekretionstest gefärbt. In einem repräsentativen Experiment zeigten in der unstimulierten Probe 1,21% der CD8⁺ Lymphozyten ein positives Signal, in der PWM-stimulierten Probe 1,4% der CD8⁺ Lymphozyten.

In einer zweiten Kontrolle wurden die Färbung von membranständigem IFN γ untersucht (ASSENMACHER 2000): je eine unstimulierte und eine PWM-stimulierte Probe wurden ohne vorherige Permeabilisierung mit dem anti-IFN γ -mAK aus der intrazellulären Zytokindetektion (IZ-DZ-anti-IFN γ -mAK) inkubiert. In beiden Proben betrug die Anzahl der gefärbten Zellen 0,02% der CD8⁺ Lymphozyten.

Ein drittes Experiment untersuchte die mögliche Bindung des anti-IFN γ -mAks an den bispezifischen Antikörper: Als zweiter anti-IFN γ -mAK wird nicht der im Sekretionassay®-kit mitgelieferte eingesetzt, sondern der IZ-DZ-anti-IFN γ -mAK in Kombination mit dem bispezifischen Antikörperkonjugat. Weder in der unstimulierten, noch in der PWM-stimulierten Probe konnten IFN γ -positive Zellen gefärbt werden. Hier liegt vermutlich eine sterische Hemmung der Bindung des zweiten Antikörpers durch Spezifität für dasselbe Epitop des IFN γ -Moleküls beider Antikörper vor.

Diese Daten legen eine hohe unspezifische Bindung des im Versuchskit gelieferten IFN γ -Detektions-Antikörper nahe.

3.2 Analyse von Tumor-reaktiven T-Zellen bei Melanompatienten

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung Tumor-reaktiver T-Zellen von Melanompatienten. Sowohl die T-Zell-Antwort gegen die autologen Tumorzellen, als auch gegen einzelne Tumorantigene wurde mittels IZ-DZ untersucht. Aufgrund des Phänotyps der reaktiven T-Zellen erfolgte die Zuordnung zu naiven, Gedächtnis- bzw. Effektor-T-Lymphozyten. Mit der Untersuchung der Expression von Zytokinen und dem zytotoxischen Mediator Granzym B wird das zytotoxische Potential der reaktiven Zellen untersucht.

3.2.1 Charakterisierung der Melanomzelllinien

Die Melanomzelllinien wurden in unserem oder dem Labor von Dirk Schadendorf in Mannheim aus resezierten Metastasen gezogen. Auf den Melanomzellen wurde die Expression von MHC I und MHC II-Komplexen durchflußzytometrisch durch Färbung von HLA-ABC-Antigenen bzw. HLA-DP, -DQ und DR-Antigenen bestimmt. In allen Fällen konnte eine Expression von HLA-ABC-Antigenen nachgewiesen werden. Die Melanomzellen des Patienten 5 zeigten keine Expression von HLA-DR-Epitopen. Die Resultate, sowie das Herkunftsgewebe der Metastasen sind der **Tabelle 3.1** zu entnehmen

Tab. 3.1 Expression von MHC I und MHC II-Epitopen auf den autologen Melanomzelllinien

Patient	Melanom-Linie	Herkunft der Metastase	Datum der Resektion	Expression von	
				MHC I	MHC II
1	UKRV-Mel 10	Haut	28.11.1995	+++ ^a	+
2	UKBF-Mel 11	Weichteil	8.12.1998	+++	++
3	UKBF-Mel 12	Dünndarm	8.8.2000	++	+
4	UKRV-Mel 17	Lymphknoten	16.7.1996	++	++
5	UKRV-Mel 11a	Weichteil	25.5.1995	++	-
6	SB-Mel	Lymphknoten	26.10.1994	++	++

a- keine Differenz zur Isotypenkontrolle

+ I Isotypenkontrolle < Median der HLA-positive Population < 10¹

++ 10¹ < Median der HLA-positive Population < 10²

+++ 10² < Median der HLA-positive Population

3.2.2 T-Zell Reaktivität gegen autologe Melanomzellen

Bei den sechs aufgeführten Patienten wurde mittels IZ-DZ untersucht, ob Melanom-reaktive T-Zellen nachweisbar sind. Unstimulierte MNZ wurden mit den Melanomzellen im Verhältnis 10:1 für sechs Stunden in Gegenwart von Brefeldin A koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen als 4-Farben-Ansätze gegen CD3, CD4 oder CD8 und IFN γ gefärbt, wobei folgende fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper eingesetzt wurden: anti-CD3-PerCP-mAk, anti-CD4-PE-mAk, anti-CD8-APC-mAk und anti-IFN γ -FITC-mAk. Als interne Negativkontrolle wurde parallel zum Melanomzell-stimulierten Ansatz eine unstimulierte Probe mit Brefeldin A koinkubiert und gefärbt. Fünf der sechs untersuchten Patienten zeigten positive T-Zell-Antworten gegen ihre autologen Melanomzellen mit Frequenzen zwischen 0,13 und 2,17% IFN γ -produzierender Zellen in der CD3+CD8+ Population. Der Hintergrund der unstimulierten Probe wurde abgezogen. Eine T-Zell-Antwort wurde als positiv gewertet, wenn in der stimulierten Probe mindestens doppelt so viele IFN γ sezernierende Zellen wie in die Negativkontrolle gezählt wurden. Im Einzelnen besaßen die Patienten Frequenzen von 2,17%

(Patient Nr. 1), 0,3% (Pat. Nr. 2), 1,59% (Pat. Nr. 3), 0,13 (Pat. Nr. 4), 0,00% (Pat. Nr. 5) und 0,19% (Pat. Nr. 6) IFN γ -produzierender T-Zellen in Prozent der CD3+CD8+-Lymphozyten, die spezifisch gegen die autologen Melanomzellen reagierten. Bei zwei Patienten (Nr. 5 und Nr. 6) konnten neben Melanom-reaktiven CD8+ T-Zellen auch 0,06 bzw. 0,1% IFN γ +CD3+CD4+ T-Helfer-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Frequenzen der reaktiven T-Zellen in den einzelnen Subpopulationen sind in **Tabelle 3.2** wiedergegeben.

Tab. 3.2 T-Zell-Antwort gegen die autologen Melanomzellen

Patient	Datum der Blutabnahme	Lymphozyten-population	IFN γ + in % der CD3+CD8+	
			Hintergrund (HG)	Melanomzellen (HG substrahiert)
1	8.2.1996	CD8+	0,04	2,17^a
		CD4+	0,08	0
2	17.12.1998	CD8+	0,06	0,30
		CD4+	0,01	0,02
3	10.8.2000	CD8+	0,47	1,59
		CD4+	0,01	0
4	8.8.1996	CD8+	0,03	0,13
		CD4+	0,03	0,01
5	4.10.1995	CD8+	0,02	0
		CD4+	0,01	0,06
6	25.7.1994	CD8+	0	0,19
		CD4+	0,02	0,10

^a**Fettgedruckt** sind die positiven Reaktionen.

Eine T-Zell-Antwort wurde als positiv gewertet, wenn in der stimulierten Probe mindestens doppelt so viele IFN γ -sezernierende Zellen wie in die Negativkontrolle gezählt wurden und die Differenz zwischen stimulierter und unstimulierter Probe mindestens 0,05% der CD3+CD8+-T-Zellen betrug.

3.2.3 Phänotypbestimmung der Melanom-reaktiven T-Lymphozyten

Die CD8⁺ Lymphozytenpopulation gliedert sich in weitere Subpopulationen. Nur die CD8⁺CD45RA⁺ Effektorzellen und die CD8⁺CD45R0⁺ Gedächtniszellen sind, im Gegensatz zu den CD8⁺CD45RA⁺ naiven T-Zellen, fähig IFN γ zu produzieren (HAMANN 1997). Bei vier der sechs Patienten wurde der Phänotyp der Melanom-reaktiven Zellen bezüglich der Expression von CD45RA analysiert. Die Mehrzahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen der untersuchten Patienten ist CD45RA positiv: Bei Patient 1 sind es 73% der IFN γ -produzierenden CD3⁺CD8⁺ T-Zellen, in Patient 2 beträgt die Anzahl 56%, Patient 3 zeigt 73% und Patient 4 66% CD45RA⁺IFN γ ⁺CD8⁺CD3⁺ T-Lymphozyten. Zusätzliche CCR7-Färbungen konnten zeigen, dass zwischen <1% und 50% der IFN γ ⁺ Population den Lymphknoten-Homing-Rezeptor CCR7 exprimierten, im Einzelnen 22% bei Patient 1, 31% bei Patient 2, 27% bei Patient 3 und <1% bei Patient 4. Obwohl in den meisten Fällen wegen der eingeschränkten Anzahl verfügbarer Kanäle am Durchflußzytometer keine gleichzeitige Färbung von CD45RA und CCR7 durchgeführt werden konnte, ist aus den Daten der Einzelfärbungen offensichtlich, dass die Melanom-reaktiven T-Zellen bei allen Patienten eine gemischte Population aus Effektor- und Gedächtniszellen darstellen. **Abbildung 3.7** zeigt einen Einzelfall, in dem bei Patient 2 eine simultane Färbung von CD45RA und CCR7 durchgeführt wurde. Eine Zusammenstellung der Daten ist **Tabelle 3.3** zu entnehmen.

Tabelle 3.3 Phänotyp Melanom-reaktiver T-Zellen

Patient	IFN γ ⁺ in % der CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	Expression phänotypischer Marker in % der		
		IFN γ ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T Zellen		
		CD45RA	CCR7	Granzym B
1	2,17	73	22	67
2	0,30	56	31	73
3	0,71	73	27	46
4	0,13	66	<1	45
5	0	-	-	-
6	0,19	-	-	-

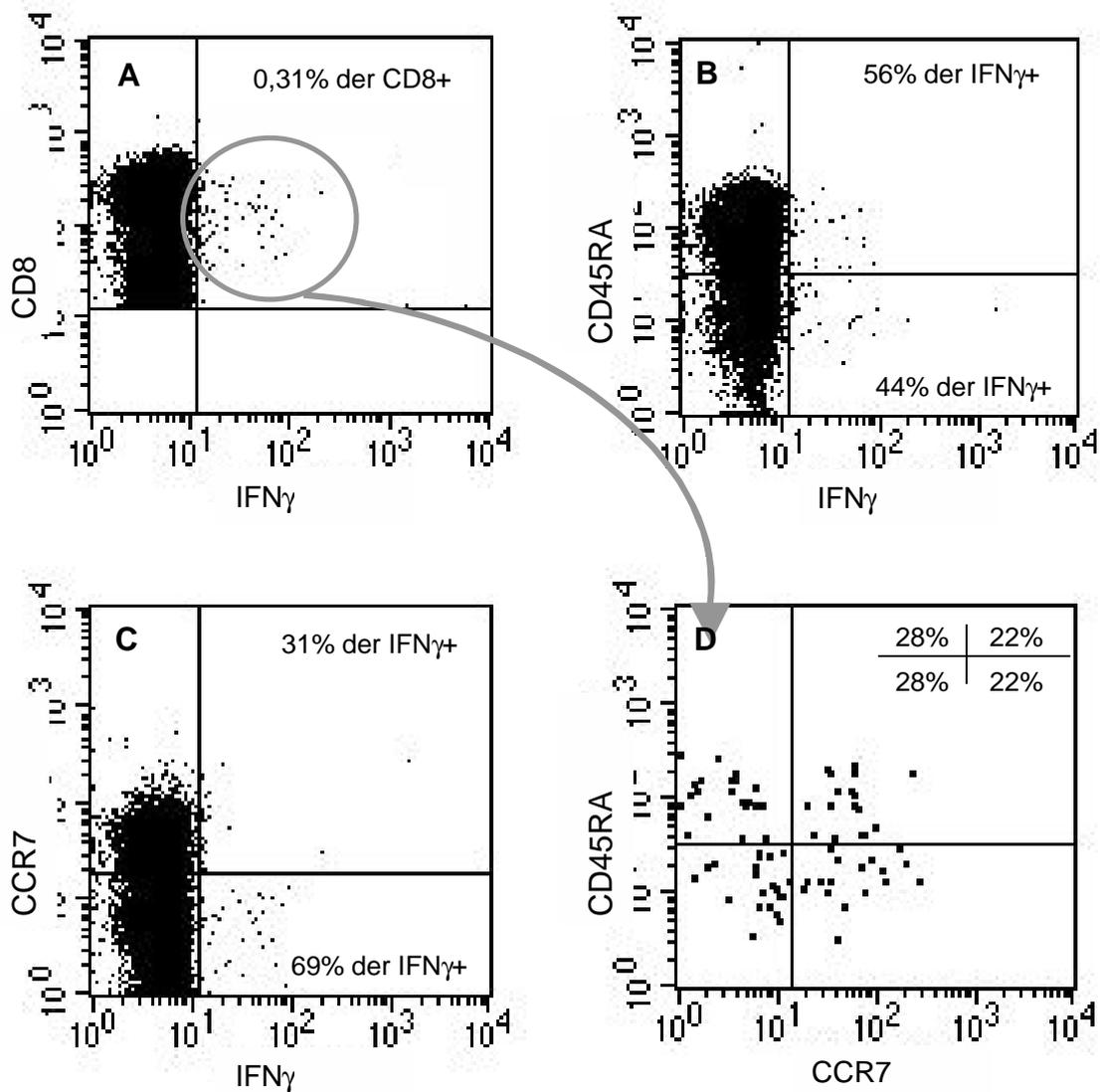


Abbildung 3.7 Phänotypcharakterisierung der Melanom-reaktiven T-Zellen bei Patient 2.

Zunächst erfolgt die Darstellung der Melanomreaktiven Zellen im CD8/IFN γ -Diagramm (**A**). Dann werden die CD8+ Lymphozyten im CD45RA/IFN γ bzw. CCR7/IFN γ -Diagramm abgebildet (**B** und **C**). Nachdem die CD8+IFN γ -Zellen in ein „gate“ gelegt wurden, wird die CD8+IFN γ + Population im CD45RA/CCR7-Diagramm dargestellt (**D**).

3.2.4 Nachweis von Granzym B in Melanom-reaktiven T-Zellen

Die Serinprotease Granzym B induziert in den Zielzellen Antigen-spezifischer Lymphozyten Apoptose. Von CD8⁺ T-Zellen und natürlichen Killer-(NK)-Zellen wird Granzym B in zytoplasmatischen Granula gespeichert und exozytotisch freigesetzt. Der Nachweis von Granzym B in den Melanom-reaktiven Zellen demonstriert das zytotoxische Potential der Population. Die Darstellung erfolgte in der Mehrfarben-Durchflußzytometrie durch intrazelluläre Färbung des gespeicherten Enzyms. Die MNZ der Patienten 1, 2, 3 und 4 wurden auf die Expression von Granzym B untersucht. Zwischen 45% und 73% der Melanom-reaktiven IFN γ + Zellen der Patienten 1 bis 4 exprimierten Granzym B. **Abbildung 3.8** zeigt ein exemplarisches Beispiel der IZ-DZ von Melanom-reaktiven T-Zellen auf Granzym B von Patient 1.

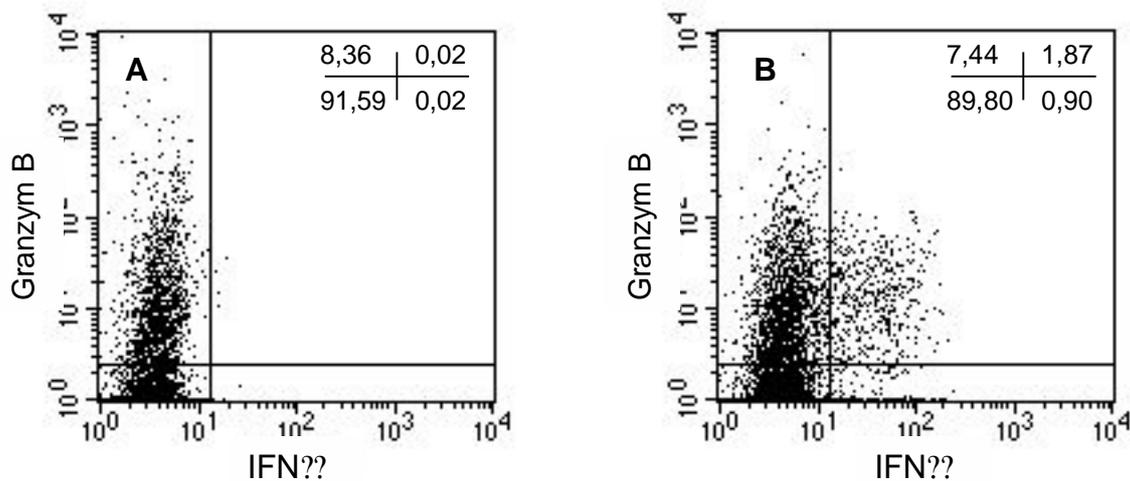


Abbildung 3.8 Granzym B-Expression in Melanom-reaktiven T-Zellen

Dargestellt sind die Melanom-reaktiven (**B**) im Vergleich zu den unstimulierten (**A**) CD3⁺CD8⁺ T-Zellen im Granzym B/IFN γ -Diagramm. Angegeben sind die Frequenzen der Granzym B+IFN γ + Lymphozyten als Prozentsatz der CD3⁺CD8⁺ Lymphozyten.

3.2.5 T-Zell-Reaktivität gegen TAA

Die Reaktivität der MNZ von Patient 2 gegen TAA von Melanomen wurde durch Kurzzeitinkubation mit HLA-A2 Epitopen der Tyrosinase, von MelanA/MART-1 und von gp 100 untersucht. 0,16% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen reagieren auf das HLA-A2-bindenden

Tyrosinase-Peptid Tyr₃₆₈₋₃₇₆ mit IFN γ -Produktion. Auf das Peptid MART-1₂₇₋₃₆ reagierten 0,03% der Lymphozyten und 0,02% auf das Glykoprotein 100-Peptid gp 100₁₅₄₋₁₆₂. **Abbildung 3.9** gibt die Frequenzen TAA-reaktiver T-Zellen im Vergleich zur T-Zell-Antwort gegenüber den autologen Melanomzellen grafisch wieder.

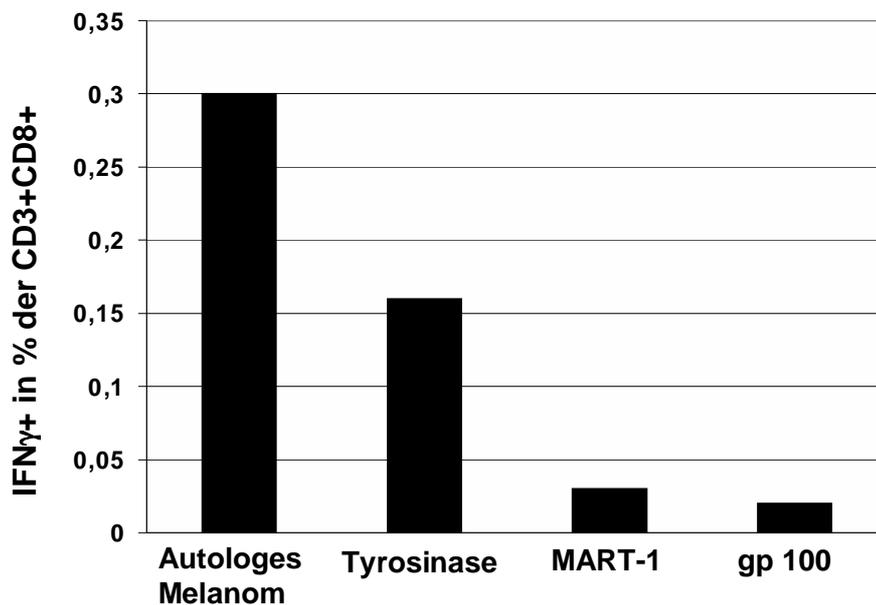


Abbildung 3.9 T-Zell-Antwort gegen ausgewählte Melanom-TAAs.

T-Zell-Antwort der MNZ von Patient 2 gegen die autologe Melanomlinie und drei HLA-A2-bindende Epitope, Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆, MART-1₂₇₋₃₆ und gp100₁₅₄₋₁₆₂. Die MNZ stammen von einer Blutabnahme im März 1999.

In einer weitergehenden Untersuchung im Labor von Danila Valmori in Lausanne, die nicht Teil dieser Doktorarbeit war, wurden mit den MNZ von Patient 2 von einer Blutabnahme von September 2000 (9/00) Tetrameranalysen mit den Peptiden Melan-A₂₆₋₃₅ und Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆ durchgeführt. Mit dem Melan-A-Tetramer färbten sich 0,2% der CD8+ MNZ, 5,6% der CD8+ MNZ waren positiv für das Tyrosinase-Tetramer und präsentierten einen einheitlichen CD45RA+CCR7- Phänotyp, der auch über viele Monate nachweisbar war. In weiterführenden Experimenten konnte für diese T-Zellen nach direkter ex vivo Separation mittels Tetrameren deren direkte lytische Aktivität gegen Tumorzellen im Zytotoxizitätsassay gezeigt werden (VALMORI 2002).

3.2.6 Stabilität der T-Zell-Reaktivität über die Zeit

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die T-Zell-Antwort gegen die autologen Melanomzellen quantitativ oder qualitativ während des Krankheitsverlaufes ändert. Zellen desselben Patienten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels IZ-DZ untersucht. Die T-Zell-Antwort gegen die autologen Tumorzellen war bei Patient 2 über etwa zwei Jahre relativ konstant: Am 17.12.1998 reagierten 0,3% der CD8+ Lymphozyten, am 24.3.1999 0,26% und am 8.7.1999 0,3% der CD3+CD8+ T-Zellen. Die Reaktion auf das Tyrosinase-Peptid₃₆₈₋₃₇₆ derselben Zeitpunkte betrug 0,07%, 0,16% und 0,16% (Abb. 3.10 A). Bei Patient 3 nahm die T-Zellreaktivität gegenüber der Melanomlinie über einen Zeitraum von zwei Jahren um den Faktor 7 zu: am 9.6.1998 reagierten 0,24% der CD3+CD8+Lymphozyten, am 10.3.1999 zeigten sich 0,29% IFN γ + T-Zellen, 1,59% der CD8+ Lymphozyten reagierten am 10.8.2000 mit IFN γ -Produktion (Abb. 3.10 B). Die **Abbildung 3.10** stellt die T-Zell-Reaktivität über den Verlauf von Monaten grafisch dar.

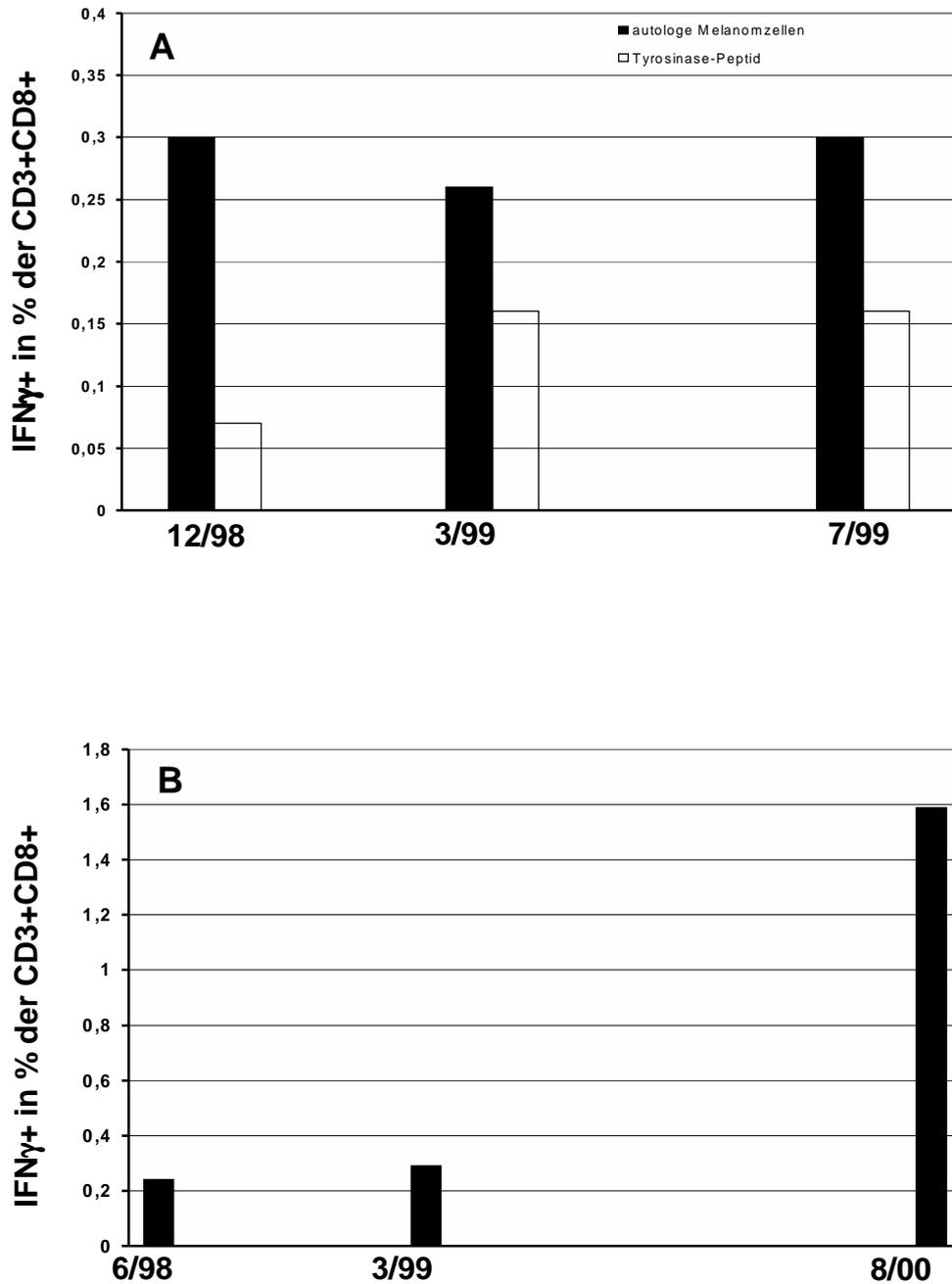


Abbildung 3.10 T-Zell-Antwort gegen das autologe Melanom über 2 Jahre

Darstellung der T-Zell-Antwort von Patient 2 (A) und Patient 3 (B) gegen die autologe Melanomzelllinie über 20, bzw. 30 Monate (■). Abbildung A zeigt außerdem die Reaktivität gegen das Tyrosinase-Peptid Tyr₃₆₈₋₃₇₆ (▨).

3.2.7 Klinischer Verlauf der Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die MNZ von sechs Patienten mit metastasiertem Melanom im klinischen Stadium IV nach UICC untersucht.

Patient 1 hatte nach Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der Analyse eine systemische Chemotherapie, bestehend aus Vindesin (VDS) und IFN α , Dacarbazin (DTIC) und Cisplatin (CDDP) erhalten. Trotz Chemotherapie war das Melanom progredient mit Manifestation von Metastasen der Haut, Lymphknoten, der Lunge und des Gehirns.

Patient 2 stellte sich mit einer initialen Melanommanifestation am Fuß vor. Nach R0-Resektion des Primärtumors erhielt der Patient zunächst keine Therapie. Nach Auftreten und Resektion eines Lokalrezidivs wurde eine Vakzinierung mit einem MAGE-3-Peptid durchgeführt. Unter dieser Therapie trat wiederum ein Lokalrezidiv am Fuß auf. Nach erneuter Resektion wurde der Patient systemisch mit CDDP, DTIC und IFN α therapiert.

Patient 3 erhielt nach Resektion des Primärtumors adjuvant systemisch IFN α . Nach Auftreten und Resektion einer kutanen Metastase wurde der Patient mit Tyrosinase-Peptid geimpft. Zwei Jahre nach Erstdiagnose wurde eine Metastase im Dünndarm reseziert. Seither besteht kein Anhalt für eine weitere Melanommanifestation.

Patient 4 erhielt initial eine systemische Therapie mit VDS und IFN α . Unter dieser Therapie bestand Progredienz des malignen Melanoms mit Metastasenlokalisierung der Haut und Lymphknoten. Eine Vakzinierung mit autologen IL-12-tranfizierten Melanomzellen wurde durchgeführt, worunter weiterhin Progredienz bestand.

Patient 5 wurde systemisch mit IFN α , IL-2 und DTIC behandelt, unter dieser Therapie war das Melanom progredient. Ebenso konnte keine Stabilisierung der Erkrankung durch eine Chemotherapie mit Fotemustin erreicht werden.

Patient Nr. 6 erhielt nach Resektion einer Lymphknotenmetastase adjuvant $\text{IFN}\alpha$. Innerhalb weniger Monate traten erneut zunächst Lymphknoten- und dann Organmetastasen auf, an denen der Patient auch verstarb.

Die tabellarische Zusammenstellung der Daten gibt **Tabelle 3.3** wieder.

Tab. 3.4 Patientencharakteristika

	Patient		Bisherige Behandlung		Status zum Zeitpunkt der Analyse		
	HLA-typ	Blut-abnahme	Therapie	Ansprechen	Tumor-stadium	Metastasen-Lokalisation	Tumorstatus
1	A2/A9, B44/- Cw4/-	8.2.1996	VDS+IFN α ; DTIC, CDDP	PD	IV	Haut, LK, Lunge, Gehirn	PD
2	A1/A2,	17.12.1998	Keine Therapie	PD	IV	Weichteil	PD
	B7/B44	24.3.1999	MAGE-3-	PD		und	PD
	Cw7/-	7.9.2000	Vakzinierung	PD		Knochen	NED nach Resektion d.
		7.9.2001	CDDP/DTIC/IFN α			n.a.	WT u. Knochenmetastase
3	A11/A24	9.6.1998	IFN α adjuvant,	n.a.	IV	n.a.	NED nach Resektion d.
	B38/B61	10.3.1999	Tyrosinase-	n.a.		n.a.	Hautmetastase
	Cw2	10.8.2000	Vakzinierung adjuvant			Dünndarm	NED nach Resektion der
		29.1.2001				n.a.	Dünndarmmetastase
4	A1/A3, B62/B57 Cw3/Cw6	8.8.1996	VDS/IFN α , IL-12/autologe Melanomvakzinierung	PD	IV	LK, Haut	PD
5	A2/A24 B8/B62 Cw3/Cw4	4.10.1995	IFN α +IL-2; DTIC, Fotemustin	n.a.	IV	Weichteil	PD
6	A2/-, B8/- C	25.7.1994	IFN α adjuvant	n.a.	IV	LK	PD

NED=Kein Nachweis der Erkrankung, CR=Komplette Remission, n.a.= nicht analysiert,
PD=Progredienz

3.3 Charakterisierung Tyrosinase-reaktiver T-Zellen

Im dritten und letzten Teil dieser Arbeit wurden Tyrosinase-reaktive MNZ eines HLA-A1-positiven Melanompatienten phänotypisch charakterisiert. Mittels ELISPOT-Assay wurden die Reaktivitäten gegen HLA-A1-Kandidatenepitope der Tyrosinase untersucht. Anschließend wurden durchflußzytometrisch Phänotypenanalysen der reaktiven T-Zellen durchgeführt.

3.3.1 Identifizierung eines neuen HLA-A1 bindenden Tyrosinase-Kandidaten-Epitopes

Unter Verwendung der SYFPEITHI-Datenbank (RAMMENSEE 1999) wurden computergestützt nach folgendem Algorithmus fünf HLA-A1-bindende Epitope aus dem Tyrosinase-Protein isoliert: Es handelt sich um 9–11mer Peptide, die in Position 3 die Aminosäuren Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E) besitzen und an deren Carboxyterminus Tyrosin (Y) positioniert ist. Nach diesem Muster wurden folgende Tyrosinase-Peptide ausgewählt: Tyr₄₅₄₋₄₆₃, Tyr₁₄₆₋₁₅₆, Tyr₂₂₇₋₂₃₅, Tyr₅₁₇₋₅₂₅ und Tyr₂₄₃₋₂₅₁. Die **Tabelle 3.5** listet die fünf Kandidaten-Epitope auf. Zwei dieser Peptide, Tyr₁₄₆₋₁₅₆ und Tyr₂₄₃₋₂₅₁ wurden bereits als Tyrosinase-Epitope beschrieben und konnten hier als interne Kontrolle eingesetzt werden (KAWAKAMI 1998, KITTLESEN 1998).

Tabelle 3.5 HLA-A1-bindende Tyrosinase-Kandidatenepitope

Aminosäureposition	Aminosäuresequenz	Score
454-463	DSDPDSFQDY^a	36
146-156	SSDYVIPIGTY ^b	31
227-235	GDENFTIPY	29
517-525	EKEDYHSLY	28
243-251	KCDICTDEY ^c	25

^a**Fettgedruckt** ist das neu charakterisierte Epitop (SCHEIBENBOGEN 2002).

^bVon der Arbeitsgruppe Rosenberg als ZTL-Epitop beschrieben (KAWAKAMI 1998)

^cVon der Arbeitsgruppe Slingluff als ZTL-Epitop beschrieben (KITTELSEN 1998)

Die MNZ von zehn HLA-A1-positiven Melanompatienten im Stadium IV wurden auf T-Zell-Reaktivität gegen diese fünf Peptiden getestet. Vier Patienten befanden sich nach einer Therapie mit Zytokinen in klinischer Remission. Ausgehend von der Annahme, dass diese Patienten Melanom-reaktive T-Zellen besitzen, wurden die MNZ dieser Patienten als Screening-Instrument für die Kandidaten-Peptide im ELISPOT-Assay eingesetzt (SCHEIBENBOGEN 2002). Alle vier Patienten besaßen T-Zell-Antwort gegen ein oder zwei der Peptide. Von jedem Patienten wurde ein anderes Peptid oder unterschiedliche Kombinationen von Peptiden erkannt. Die ELISPOT-Ergebnisse sind in **Tabelle 3.6** wiedergegeben.

Tabelle 3.6 T-Zell-Antworten gegen HLA-A1-bindende Tyrosinase-Peptide bei Patienten mit Melanom

Patient	Tyr ₄₅₄₋₄₆₃	Tyr ₁₄₆₋₁₅₆	Tyr ₂₂₇₋₂₃₅	Tyr ₅₁₇₋₅₂₅	Tyr ₂₄₃₋₂₅₁	HG	PWM
1	399^{ab}	60	57	64	172	62	673
2	40	34	10	12	9	12	439
3	21	37	19	18	19	15	895
4	35	52	53	37	72	41	456

^a **Fettgedruckt** sind die positiven T-Zell-Antworten.

^bDie Zahlen geben die Anzahl der Tyrosinase-reaktiven Zellen im IFN γ -ELISPOT-Test wieder

Aus den MNZ gesunder HLA-A1+ Spendern konnten in weiterführenden Experimenten, die nicht Teil dieser Doktorarbeit waren, zytotoxische T-Zell-Linien (ZTL) generiert werden, die gegen das Kandidatenepitop Tyr₄₅₄₋₄₆₃ gerichtet waren. Diese ZTLs konnten – wie Blockierungsexperimente mit W6/32 zeigten HLA-restringiert Tyr₄₅₄₋₄₆₃-beladene Zielzellen im Zyotoxizitätsassay lysieren (SCHEIBENBOGEN 2002(a)).

3.3.2 Phänotypen Tyrosinase-reaktiver T-Zellen

Einer der untersuchten HLA-A1-positiven Melanompatienten (Patient 1 aus Tabelle 3.6) zeigte nach Koinkubation mit dem Peptid Tyr₄₅₄₋₄₆₃ 337 IFN γ -sezernierende T-Zellen/1x10⁶ MNZ im ELISPOT-Assay, die 0,16% CD8+CD3+Lymphozyten entsprechen. Die Angaben entsprechen

den Frequenzen abzüglich der IFN γ + Zellen in der unstimulierten Probe. Mit den MNZ des Patienten 1 wurden weitergehende durchflußzytometrische Analysen durchgeführt, um die Tyrosinase-reaktiven Lymphozyten phänotypisch zu charakterisieren. MNZ von drei verschiedenen Zeitpunkten wurden mit dem Peptid Tyr₄₅₄₋₄₆₃ koinkubiert. Die Ergebnisse des ELISPOT-Assays konnten bestätigt werden. Die Proben von Februar 1998 ergaben eine Anzahl von 0,40% CD8+CD3+IFN γ + Zellen, die Proben vom April 1998 zeigten 0,21% und diejenigen vom Juni 1998 0,13% CD3+CD8+ T-Zellen (alle Angaben abzüglich der Zahlen in der Negativkontrolle). In **Abbildung 3.12** sind die IFN γ -CD8-Diagramme der drei Zeitpunkte jeweils mit und ohne Tyrosinase-peptid abgebildet.

Außerdem wurden bei den MNZ vom Juni 1998 zusätzliche Charakterisierungen mit anti-Granzym B-mAK durchgeführt, um das zytolytische Potential dieser Zellen zu untersuchen. 80% der Tyrosinase₄₅₄₋₄₆₃ spezifischen T-Lymphozyten produzieren auch Granzym B. **Abbildung 3.11** stellt die Expression von Granzym B in Tyrosinase-reaktiven T-Zellen von Patient 1 dar.

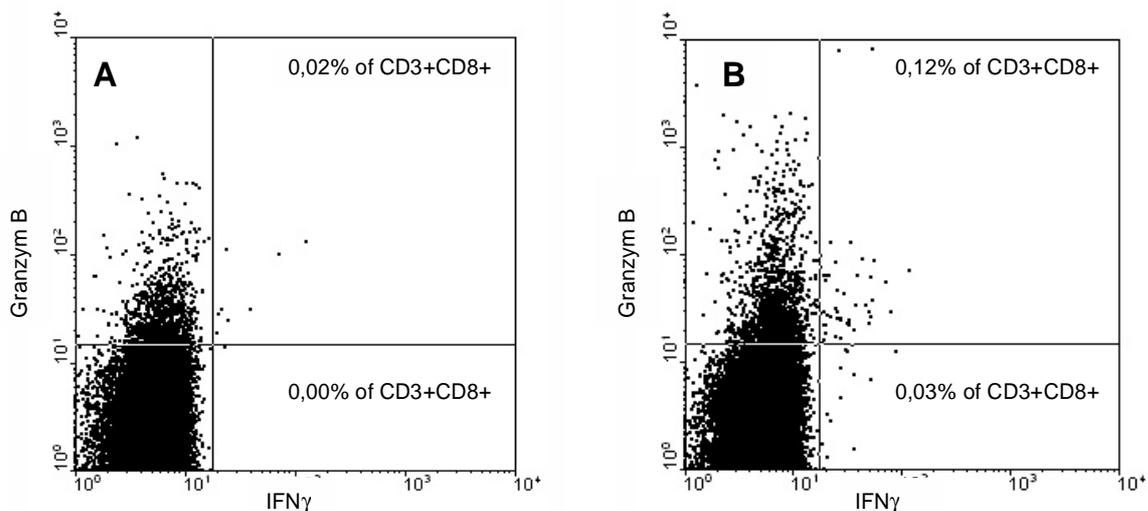


Abbildung 3.11 Granzym B-Expression der Tyr₄₅₄₋₄₆₃-reaktiven T-Zellen bei einem Melanompatienten

Dargestellt sind die Tyr₄₅₄₋₄₆₃-reaktiven (**B**) im Vergleich zu den unstimulierten (**A**) CD3+CD8+ T-Zellen im Granzym B-IFN γ -Diagramm. Angegeben sind die Frequenzen der Granzym B+IFN γ + Lymphozyten als Prozentsatz der CD3+CD8+.

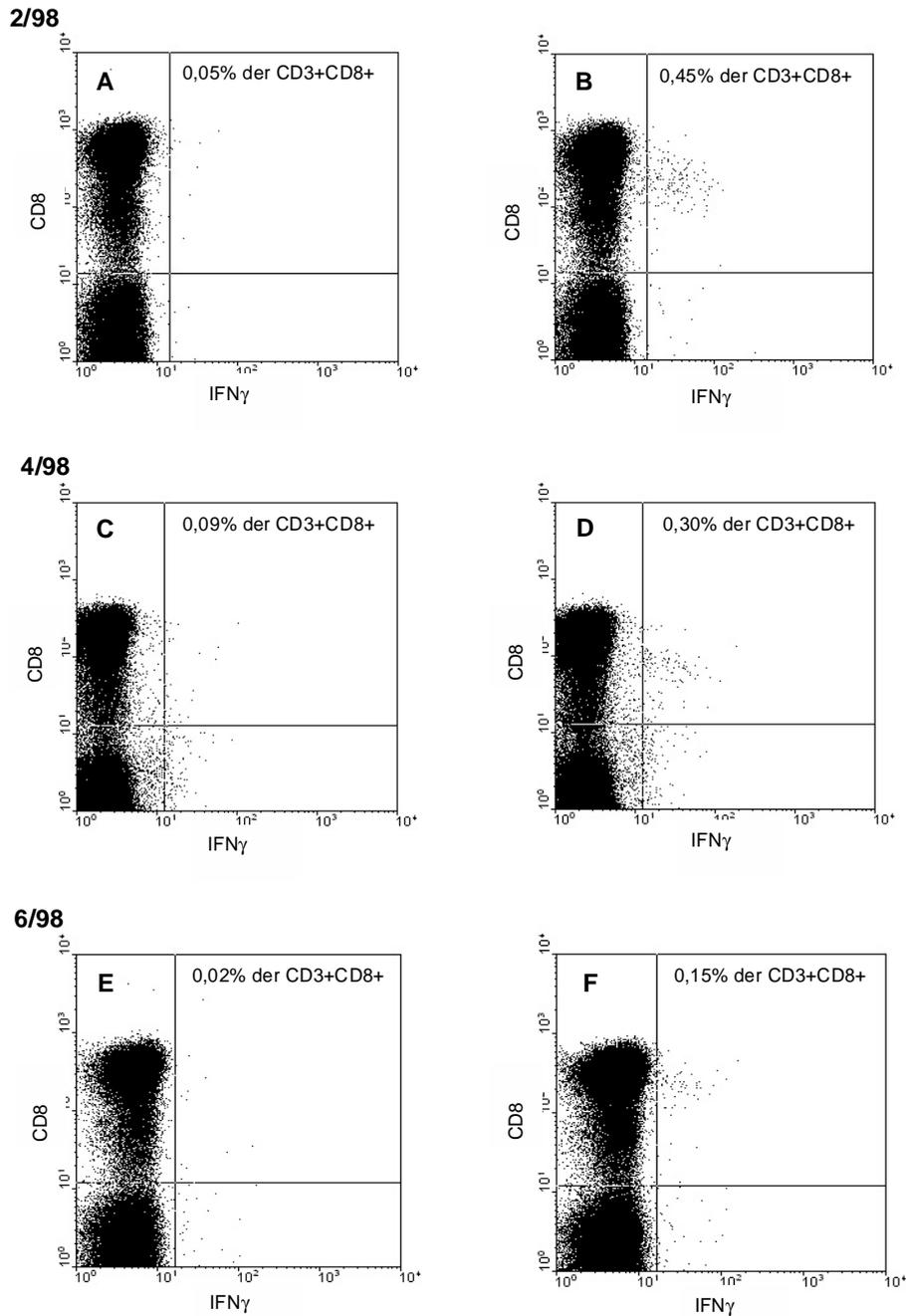


Abbildung 3.12 Frequenzen Tyr₄₅₄₋₄₆₃-reaktiver T-Zellen bei einem Melanompatienten über 5 Monate.

Dargestellt sind die Tyr₄₅₄₋₄₆₃-reaktiven T-Zellen von drei verschiedenen Zeitpunkten (Februar: **A+B**, April: **C+D** und Juni: **E+F** 1998). Die Diagramme **B**, **D** und **F** zeigen die Peptid-stimulierten Proben im Vergleich zu den unstimulierten Proben **A**, **C** und **E**. Die Peptid-reaktiven T-Zellen wurden durch IZ-DZ nachgewiesen. Die Frequenz der CD3+CD8+IFN γ + Zellen ist als Prozentsatz der CD3+CD8+ T-Lymphozyten angeben.