

Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Aus der Medizinischen Klinik III
Direktor: Prof. Dr. med. Eckhard Thiel

Unterschiede in der T-Zell-Immunität gegen die Tumorantigene EpCAM, CEA und her-2/neu
bei Patienten mit Mammakarzinom und kolorektalem Karzinom

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Charité - Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: Mariatu Binta Leigh
aus: Dortmund

Referentin: Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen

Koreferent: Prof. Dr. med. Antonio Pezzutto

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Datum der Disputation: 19.07.2005

Promoviert am: 16.09.2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7-25
1.1 Immunüberwachung von Tumorwachstum	
1.2 Immuntherapie von Tumoren	
1.3 Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen	
1.4 Tumorassoziierte Antigene	
1.4.1 Gruppen tumorassoziiierter Antigene	
1.4.1.1 Aktivierungs-Antigene (Cancer testis Antigene)	
1.4.1.2 Differenzierungs-Antigene	
1.4.1.3 Überexpressions-Antigene	
1.4.1.4 Mutations-Antigene	
1.4.1.5 Virale Antigene	
1.4.2 Ep-CAM	
1.4.3 Her-2/neu	
1.4.4 CEA	
1.5 Tumorreaktive T-Zellen	
1.5.1 Tumorreaktive T-Zellen beim kolorektalen Karzinom	
1.5.2 Tumorreaktive T-Zellen beim Mammakarzinom	
1.6 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen	
1.7 Zielsetzung der Arbeit	
2 Material und Methoden	26-33
2.1 Material	
2.1.1 Mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut	
2.1.2 Kulturmedium	
2.1.3 Einfriermedium	
2.1.4 Phosphatpuffer	
2.1.5 Dichtegradient	
2.1.6 Antikörper zur HLA-A*0201-Bestimmung	

2.1.7	Peptide und PWM	
2.1.8	Antikörper für den ELISPOT-Assay	
2.2	Methoden	
2.2.1	Gewinnung von mononuklearen Zellen aus heparinisiertem Vollblut	
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	
2.2.3	Zellen auftauen	
2.2.4	HLA-A2-Bestimmung mittels Durchflußzytometrie	
2.2.5	IFN- γ -ELISPOT-Assay	
2.3	Statistische Analysen	
3	Ergebnisse	34-50
3.1	Patienten und Kontrollpersonen	
3.1.1	Kontrollgruppe	
3.1.2	Kolorektales-Karzinom-Patienten	
3.1.3	Mammakarzinom-Patienten	
3.2	T-Zell-Antworten	
3.2.1	T-Zell-Antworten gesunder HLA-A2*0201-positiver Kontrollpersonen gegen tumorassoziierte Antigene und Influenza	
3.2.2	Spontane T-Zell-Antworten HLA-A2*0201-positiver Kolorektales-Karzinom-Patienten gegen tumorassoziierte Antigene und Influenza	
3.2.3	Spontane T-Zell-Antworten HLA-A2*0201-positiver Mammakarzinom-Patienten gegen tumorassoziierte Antigene und Influenza	
3.2.4	Statistische Analyse	
3.3	T-Zell-Antworten unter spezifischer Antikörper-Therapie	
3.3.1	T-Zell-Antworten unter Herceptin®-Therapie	
3.3.2	T-Zell-Antworten unter Panorex®-Therapie	

	Seite	
4	Diskussion	51-64
4.1	T-Zell-Antworten beim kolorektalen Karzinom	
4.2	T-Zell-Antworten beim Mammakarzinom	
4.3	Unterschiede der T-Zell-Antworten beim kolorektalen Karzinom und Mammakarzinom	
4.3.1	Vergleichbarkeit der Patientengruppen	
4.3.2	Existenz von spezifischen T-Zellen nur in bestimmten Kompartimenten	
4.3.3	Immunologische Toleranz	
4.3.4	Existenz von spezifischen T-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze	
4.3.5	Tumor-Escape-Mechanismen	
4.3.6	Vier Hypothesen für die Gründe der unterschiedlichen T-Zell-Immunität:	
	1. Die spezifischen Eigenschaften des Kolongewebes	
	2. Der Einfluß von darmassoziierten Bakterien im Kolongewebe	
	3. Die jeweilige spezifische Tumor-Mikroumgebung beider Karzinome	
	4. Die eventuelle Erkennung anderer TAA im Falle des Mammakarzinoms	
4.4	T-Zell-Antworten nach Herceptin®- und Panorex®-Therapie	
4.5	Schlußfolgerung	
5	Literaturverzeichnis	65-86
6	Danksagung	87

Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von tumorassoziierten Antigenen (TAA) beschrieben worden. Interessanter Weise konnten bei einigen malignen Erkrankungen, wie z. Bsp. dem KRK, bereits spontane TAA-gerichtete T-Zell-Antworten nachgewiesen werden. Es ist bislang unklar, inwiefern es Unterschiede bei dem Auftreten einer spezifischen TAA-gerichteten T-Zell-Antwort bei verschiedenen Adenokarzinomen gegen gemeinsame TAA gibt.

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt mit der Fragestellung, ob und in welcher Höhe im peripheren Blut von KRK- und MK-Patienten spontane TAA-spezifische T-Zell-Antworten gegen Peptid-Epitope der gemeinsamen TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA nachweisbar sind. Hierfür verwendeten wir den IFN- γ -ELISPOT-Assay, eine sensitive, etablierte und reproduzierbare Methode zum Nachweis antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen. Hierbei erlaubt der Nachweis der IFN- γ -Sekretion den Rückschluß, daß die T-Zellen auch funktionell aktiv sind. Die eingesetzten Tumorantigene waren synthetische HLA-A*0201-restringierte Epitope von Ep-CAM p263-271, her-2/neu p654-662 und CEA p571-579. Als Kontrolle diente das Influenza-Matrix-Protein p58-66, gegen das ca. 2/3 der Bevölkerung eine Memory-T-Zell-Antwort besitzt. Die Analyse klinischer Daten der KRK- und MK-Patienten ergab, daß es sich um ähnliche Patientenpopulationen in Bezug auf Alter und die relevanten Prognosefaktoren: Tumorstadien und Vortherapien handelte.

Während wir eine spontane spezifische T-Zell-Antwort bei 5 der 27 (18,5%) KRK-Patienten detektieren konnten, war diese weder bei den 20 MK-Patienten noch bei den 12 gesunden Spendern (Kontrollgruppe) nachweisbar. T-Zell-Antworten gegen Influenza waren in allen drei Gruppen ähnlich häufig und stark. Der Vergleich dieser Daten im χ^2 -Test zeigt, daß der Unterschied zwischen der T-Zell-Reaktivität von KRK-Patienten (5/27) und der von MK-Patienten (0/20) gegen die untersuchten TAA statistisch signifikant ist ($p=0,042$). Mögliche Ursachen für diese unterschiedliche Ausprägung von spontanen T-Zell-Antworten gegen gemeinsame TAA beider Adenokarzinome, wie z. Bsp. der Einfluß von unterschiedlichen Eigenschaften des Tumor-Ursprungsgewebes und die spezifische Tumor-Mikroumgebung, sowie die eventuelle Erkennung anderer TAA, werden in der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert. Ein besseres Verständnis der Entstehung von spontanen T-Zell-Antworten gegen

TAA, sowie das Verständnis von Mechanismen, die zu einem Fehlen systemischer T-Zell-Antworten führen, sind von Bedeutung für die Weiterentwicklung T-Zell-gerichteter Vakzinierungsstrategien.

Im zweiten Teil der Studie wurde bei vier MK-Patientinnen, die Herceptin® (anti-her2/neu) erhalten hatten, sowie bei einer KRK Patientin, die Panorex® (anti-Ep-CAM) erhielt, die Induktion von spezifischen T-Zellen durch die verabreichten TAA gerichteten monoklonalen Antikörper getestet. Eine MK-Patientin zeigte T-Zell-Antworten gegen her-2/neu 9 mer p369-377; her-2/neu 17 mer p883-899 und Ep-CAM p263-271 nach dem vierten Zyklus der Herceptin®-Therapie. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine umfassendere Aussage bezüglich der Induktionsfähigkeit spezifischer T-Zellen durch die Verabreichung monoklonaler Antikörper zu treffen.

Große Teile dieser Arbeit sind in Kombination mit Ergebnissen einer weiteren Studie bereits im Juni 2003 im International Journal of Cancer veröffentlicht worden:

Nagorsen, Dirk; Scheibenbogen, Carmen; Schaller, Gerhard; Leigh, Binta; Schmittel, Alexander; Letsch, Anne; Thiel, Eckhard; Keilholz, Ulrich: Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients, Int J Cancer. 2003 Jun 10; 105 (2): 221-5.